

**VŠB – Technická univerzita Ostrava**  
**Fakulta elektrotechniky a informatiky**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

2019

Bc. Karolína Danišová

**VŠB – Technická univerzita Ostrava**  
**Fakulta elektrotechniky a informatiky**  
**Katedra kybernetiky a biomedicínského inženýrství**

**Optimalizace a klinické ověření elektrody pro měření  
koncentrace glukózy v krvi**

**Optimalization and Clinical Validation of Electrode for  
Measuring Glucose Concentration in Blood**

VŠB - Technická univerzita Ostrava  
Fakulta elektrotechniky a informatiky  
Katedra kybernetiky a biomedicínského inženýrství

## Zadání diplomové práce

Student: **Bc. Karolína Danišová**

Studijní program: N2649 Elektrotechnika

Studijní obor: 3901T009 Biomedicínské inženýrství

Téma: **Optimalizace a klinické ověření elektrody pro měření koncentrace  
glukózy v krvi**  
**Optimalization and Clinical Validation of Electrode for Measuring  
Glucose Concentration in Blood**

Jazyk vypracování: čeština

Zásady pro vypracování:

1. Analýza principu ověřované elektrody.
2. Návrh a realizace HW řetězce pro on-line záznam měřených dat z elektrody.
3. Návrh a realizace SW aplikace pro zpracování měřených dat.
4. Ověření funkčnosti navržené elektrody na různých materiálech.
5. Zhodnocení dosažených výsledků závěrečné práce.

Seznam doporučené odborné literatury:

- [1] TROJAN, Stanislav et al. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada Publishing, a.s, 2003. 772 s. ISBN 80-247-0512-5.
- [2] O'ROURKE, Robert A., Richard A. WALSH and Valentí FUSTER. *Kardiologie: Hurstův manuál pro praxi*. 1. české vyd. Překlad Hana POSPÍŠILOVÁ. Praha: Grada, 2010. xxxi, 767 s. ISBN 978-80-247-3175-9.
- [3] MITRO, Peter a Gabriel VALOČÍK. *Vyšetřovací metody v kardiologii: vysokoškolská učebnice*. 1. vyd. Košice: Equilibria, 2009. 391 s. ISBN 978-80-89284-26-9.
- [4] PENHAKER, Marck et al. *Lékařské diagnostické přístroje: učební texty*. 1. vyd. Ostrava: VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2004. 320 s. ISBN 80-248-0751-3.
- [5] ALBERTS, Bruce et al. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. Překlad Arnošt KOTYK, Bohumil BOUZEK a Pavel HOZÁK. 2. vyd. Ústí nad Labem : Espero Publishing, 2005. xxvi, 630 s. ISBN 80-902906-2-0.

Formální náležitosti a rozsah diplomové práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Martin Augustynek, Ph.D.**

Datum zadání: 01.09.2017

Datum odevzdání: 30.04.2019



doc. Ing. Jiří Koziorek, Ph.D.  
*vedoucí katedry*



prof. Ing. Pavel Brandštetter, CSc.  
*děkan fakulty*

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně. Uvedla jsem všechny literární prameny a publikace, ze kterých jsem čerpala.

V Ostravě dne: 29. 4. 2019



Podpis studenta

## **Poděkování**

Děkuji vedoucímu práce panu doc. Ing. Martinu Augustynkovi, PhD. za vedení diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat panu Ing. Tomáši Klinkovskému a slečně Ing. Kláře Fiedorové za cenné rady a informace podstatné pro vypracování práce.

## Abstrakt

Diplomová práce spočívá v modifikaci a optimalizaci elektrodového systému pro měření koncentrace glukózy. K elektrodovému systému je potřeba zvolit vhodný HW pro on-line záznam měřených dat a provést jeho realizaci. S tím souvisí i následné vytvoření SW aplikace, díky níž bude probíhat zpracování dat v počítači. Cílem práce je tedy vytvořit úplný měřicí systém s vhodným zpracováním, který bude následně experimentálně otestován s různými materiály elektrod na roztocích s odlišnými koncentracemi glukózy. Díky finální analýze naměřených dat bude objasněno, který elektrodový materiál je pro tento typ měření nejvhodnější.

## Klíčová slova

Biosenzor, elektroda, enzym, glukóza, glykémie.

## Abstract

The thesis consists in modification and optimization of electrode system for glucose concentration measurement. It is necessary to select a suitable HW for on-line recording of measured data and to implement it to the electrode system. This is related to the subsequent creation of a SW application, which will be used to process data on the computer. The aim of this work is to create a complete measuring system with suitable processing, which will be experimentally tested with various electrode materials on solutions with different glucose concentrations. The final analysis of the measured data will make it clear which electrode material is most suitable for this type of measurement.

## Key Words

Biosensor, electrode, enzyme, glucose, glycemia.

# Obsah

<b>Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>9</b>
<b>Seznam ilustrací .....</b>	<b>10</b>
<b>Seznam tabulek.....</b>	<b>11</b>
<b>Seznam grafů .....</b>	<b>12</b>
<b>Úvod.....</b>	<b>13</b>
<b>1 Analýza principu ověřované elektrody .....</b>	<b>14</b>
1.1 Glukóza .....	14
1.1.1 Funkce a reakce .....	14
1.1.2 Diabetes mellitus .....	15
1.2 Měření glykémie .....	15
1.2.1 Neinvazivní metody .....	16
1.2.2 Invazivní metody .....	16
1.2.3 Reakce s enzymy .....	17
1.2.4 Fotometrické měření .....	18
1.2.5 Elektrochemické měření.....	18
1.3 Měřicí biosenzory.....	19
1.3.1 Rozdělení podle bioreceptoru.....	20
1.3.2 Rozdělení podle fyzikálně-chemického převodníku .....	21
1.3.3 Materiály pro biosenzory .....	21
1.3.4 Vyhodnocení glukózy .....	22
1.4 Elektrodotový měřicí systém.....	22
1.4.1 Konstrukce elektrodotové části .....	23
1.4.2 Měřicí a napájecí obvod .....	24
<b>2 Návrh a realizace HW řetězce pro on-line záznam měřených dat z elektrod.....</b>	<b>26</b>
2.1 Přímé napojení pomocí měřicí karty .....	26
2.2 Převodní prvek pro mikrofonní vstup počítače .....	28
2.3 Ověření funkčnosti obvodu .....	29
2.4 Realizace obvodu .....	32
2.5 Vhodné materiály pro elektrodotový systém.....	33
2.5.1 Vlastnosti elektrotechnických materiálů .....	33
2.5.2 Vybrané elektrodoty pro ověření funkce systému .....	34



<b>3</b>	<b>Návrh a realizace SW aplikace pro zpracování měřených dat .....</b>	<b>37</b>
3.1	Čelní panel – mikrofonní vstup .....	38
3.2	Blokový diagram – mikrofonní vstup .....	39
3.3	Čelní panel – měřicí karta .....	43
3.4	Blokový diagram – měřicí karta.....	43
<b>4</b>	<b>Ověření funkčnosti navržené elektrody s různými materiály .....</b>	<b>46</b>
4.1	Ag/AgCl elektrody .....	47
4.2	Měděné elektrody .....	51
4.3	Pozlacené elektrody.....	55
<b>5</b>	<b>Statistická analýza.....</b>	<b>60</b>
	<b>Závěr.....</b>	<b>66</b>
	<b>Literatura.....</b>	<b>68</b>
	<b>Seznam příloh .....</b>	<b>70</b>

## Seznam použitých zkratek a symbolů

AD převodník	Analogově digitální převodník
ATP	Adenosintrifosfát
CMOS	Complementary Metal Oxid Semiconductors
CPE	Uhlíkové pastové elektrody
DM	Diabetes mellitus
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EAGLE	Easily Applicable Graphical Layout Editor
GPIO	General Purpose interface buse
ISA	Industry standart architecture
ISE	Iontově selektivní metoda
LabVIEW	Laboratory Virtual Instruments Engineering Workbench
LED	Dioda emitující světlo
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
např.	Například
PCI	Peripheral component interconnect
PXI	PCI extensions for instrumentation
RNA	Ribonukleová kyselina
SPE	Tištěné elektrody
tj.	To je
tzn.	To znamená
tzv.	Takzvaný, takzvaně
USB	Universal seriál bus

## Seznam ilustrací

Obr. 1 Glukóza [21] .....	14
Obr. 2 Glukometr [2].....	17
Obr. 3 Komplex enzym-substrát [6].....	18
Obr. 4 Glukózo-oxidázová reakce [21] .....	18
Obr. 5 Reaktanty a produkty chemických reakcí [3].....	19
Obr. 6 Konstrukce biosenzoru.....	20
Obr. 7 Možnosti vyhodnocení koncentrace glukózy [3] .....	22
Obr. 8 Elektrodotový měřicí systém [6] .....	23
Obr. 9 Elektrodotový systém [6] .....	24
Obr. 10 Schéma zapojení součástek původního obvodu [6] .....	25
Obr. 11 Multifunkční karta NI USB 4009.....	28
Obr. 12 Doplněné schéma zapojení s převodním prvem.....	29
Obr. 13 Ověření obvodu – 1V .....	30
Obr. 14 Ověření obvodu – 4047.....	31
Obr. 15 Ověření obvodu – 4066.....	32
Obr. 16 Ag/AgCl elektrody – konstrukce .....	35
Obr. 17 Měděné elektrody – konstrukce .....	35
Obr. 18 Pozlacené elektrody – konstrukce.....	36
Obr. 19 Úvodní obrazovka prostředí LabVIEW .....	37
Obr. 20 LabVIEW čelní panel – mikrofonní vstup .....	38
Obr. 21 LabVIEW blokový diagram 1 – mikrofonní vstup .....	40
Obr. 22 LabVIEW blokový diagram 2 – mikrofonní vstup .....	40
Obr. 23 LabVIEW – funkce .....	41
Obr. 24 LabVIEW blokový diagram 3 – mikrofonní vstup .....	42
Obr. 25 LabVIEW blokový diagram 4 – mikrofonní vstup .....	42
Obr. 26 LabVIEW čelní panel – měřicí karta .....	43
Obr. 27 LabVIEW blokový diagram 1 – měřicí karta.....	44
Obr. 28 LabVIEW blokový diagram 2 – měřicí karta.....	44
Obr. 29 LabVIEW blokový diagram 3 – měřicí karta.....	45

## Seznam tabulek

Tab. 1 Seznam použitých součástí.....	33
Tab. 2 Pravdivostní tabulka.....	45
Tab. 3 Koncentrace glukózy.....	46
Tab. 4 Korelační koeficienty.....	61
Tab. 5 Test normality .....	62
Tab. 6 Bartlettův test .....	62
Tab. 7 Tukeyův test – bez enzymu.....	64
Tab. 8 Tukeyův test – s enzymem.....	64

## Seznam grafů

Graf 1 Ag/AgCl elektrody 6mM bez enzymu .....	47
Graf 2 Ag/AgCl elektrody 6mM s enzymem .....	48
Graf 3 Ag/AgCl elektrody 12mM bez enzymu .....	48
Graf 4 Ag/AgCl elektrody 12mM s enzymem .....	49
Graf 5 Ag/AgCl elektrody 20mM bez enzymu .....	50
Graf 6 Ag/AgCl elektrody 20mM s enzymem .....	50
Graf 7 Porovnání napětí – Ag/AgCl .....	51
Graf 8 Měděné elektrody 6mM bez enzymu .....	51
Graf 9 Měděné elektrody 6mM s enzymem .....	52
Graf 10 Měděné elektrody 12mM bez enzymu .....	52
Graf 11 Měděné elektrody 12mM s enzymem .....	53
Graf 12 Měděné elektrody 20mM bez enzymu .....	54
Graf 13 Měděné elektrody 20mM s enzymem .....	54
Graf 14 Porovnání napětí – měděné elektrody .....	55
Graf 15 Pozlacené elektrody 6mM bez enzymu .....	56
Graf 16 Pozlacené elektrody 6mM s enzymem .....	56
Graf 17 Pozlacené elektrody 12mM bez enzymu .....	57
Graf 18 Pozlacené elektrody 12mM s enzymem .....	57
Graf 19 Pozlacené elektrody 20mM bez enzymu .....	58
Graf 20 Pozlacené elektrody 20mM s enzymem .....	58
Graf 21 Porovnání napětí – pozlacené elektrody .....	59
Graf 22 Bodové grafy – lineární závislost .....	60
Graf 23 Korelační koeficient .....	61
Graf 24 Krabicový graf 12 mM bez enzymu .....	63
Graf 25 Krabicový graf 12 mM s enzymem .....	63

# Úvod

Tato diplomová práce se zabývá optimalizací elektrody pro měření koncentrace glukózy a jejímu klinickému ověření. Navazuje na práci Ing. Kláry Fiedorové, jejímž cílem bylo zkonstruovat funkční elektrodový systém a k němu navrhnout příslušný měřicí obvod.

V první kapitole této diplomové práce budou nastíněny základní teoretické znalosti, důležité pro správné vyhotovení práce a splnění všech bodů v zadání. Jde převážně o objasnění charakteristických vlastností glukózy a jejího významu diagnostiky v medicíně. Důležitou částí je vysvětlení chemických reakcí, ve kterých figuruje glukóza, protože pochopení těchto dějů je klíčové pro pochopení funkce vlastního elektrodového systému, který je v diplomové práci použit. Následně bude nastíněna funkce biosenzorů a základní poznatky o elektrodovém systému, jehož rozvojem se tato práce zabývá.

V druhé kapitole bude vysvětleno provedení a následná realizace hardwaru umožňujícího dále zpracovat signál z měřicí části obvodu a jeho modifikace tak, aby bylo možné signál vést do počítače, v němž bude probíhat jeho další úprava.

Touto softwarovou úpravou se bude zabývat další kapitola. Nástrojem pro realizaci softwaru je zvoleno grafické programové prostředí LabVIEW. To bude obsahovat tzv. čelní panel virtuálního přístroje a programový kód v podobě blokového diagramu.

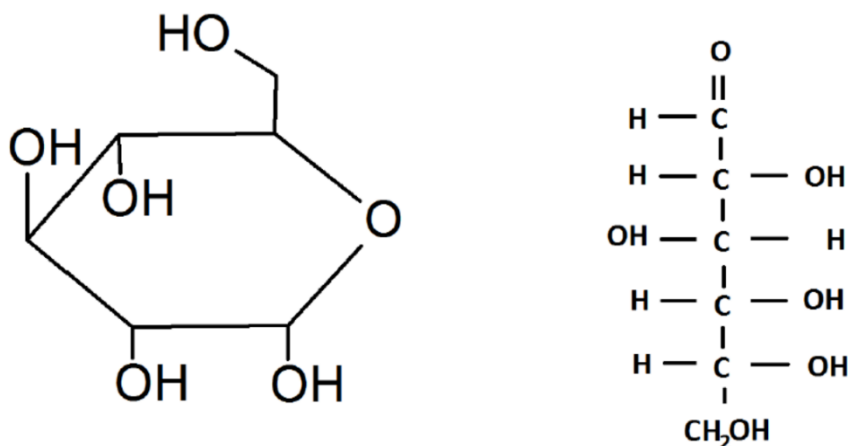
V dalších kapitolách bude popsáno experimentální ověřování elektrodového systému s již plně funkčním hardwarem a softwarem na různých materiálech a zhodnocení jejich výsledků. Naměřené výsledky budou statisticky zpracovány.

# 1 Analýza principu ověřované elektrody

Celý systém pro měření koncentrace glukózy, se kterým se pracuje, byl navržen v rámci diplomové práce Ing. Kláry Fiedorové. Tento celek se skládá z několika částí. Je tvořen elektrodovým systémem s příslušným napájením a měřicím obvodem. Koncentrace glukózy v roztoku nanášeného na určené místo v soustavě dvou elektrod je zjišťována na základě elektrického proudu. Ten je vytvořen pohybem iontů v roztoku z chemické reakce glukózy.

## 1.1 Glukóza

Glukóza je monosacharid a spadá do skupiny aldohexóz. To znamená, že obsahuje na rozdíl od polysacharidů a disacharidů pouze jednu sacharidovou jednotku a její karbonylová skupina se nachází na první pozici. Termín karbonylová skupina udává existenci dvojné vazby mezi atomem uhlíku a kyslíku. U ketohexóz, mezi něž patří např. fruktóza (ovocný cukr), se tato dvojná vazba nachází až na druhé pozici. Glukóza, jejíž sumární vzorec je  $C_6H_{12}O_6$ , existuje ve dvou izomerních formách. Skupina izomerních látek se vyznačuje tím, že všechny látky nacházející se v této skupině mají stejný sumární vzorec, ale odlišný konfigurační vzorec. V přírodě se vyskytuje nejčtenější forma D-glukóza (jinak krevní cukr nebo hroznový cukr), která je zastoupena v lidském organismu a v rostlinách, pro které je též důležitým zdrojem energie. Je jedním z produktů fotosyntézy a vyskytuje se především v rostlinných plodech. L-forma je tzv. optickým izomerem glukózy se zrcadlově obráceným konfiguračním vzorcem. Jedinou diferencí mezi D a L formou je, že jejich vodní roztok stáčí rovinu polarizovaného světla na opačnou stranu. Stejný sumární vzorec má také galaktóza s lehce odlišným prostorovým uspořádáním. [1] [2] [5] [21]



Obr. 1 Glukóza [21]

### 1.1.1 Funkce a reakce

Glukóza jako sacharid patří společně s tuky a bílkovinami mezi základní makroživiny mající pro člověka nezastupitelný význam zejména proto, že je nejrychlejším a nejzákladnějším zdrojem energie pro lidský organismus. Člověk sacharidy přijímá v potravě nejčastěji ve formě polysacharidů, které se

začínají štěpit již v dutině ústní na jednodušší disacharidy a poté monosacharidy. Konečný rozklad a následné zpracování monosacharidů probíhá v tenkém střevě, kde dochází pomocí difúzních přesunů k uložení v játrech a případnému využití dle energetické potřeby. Zcela nezbytná je glukóza pro mozek a červené krvinky, pro které je jediným zdrojem energie. Jejich denní spotřeba činí minimálně 150 g glukózy, a pokud tato podmínka není splněna, může dojít ke katabolickým procesům zahrnujícím tvorbu glukózy glukoneogenezí nebo ketogenezí. V rámci těchto dějů se při rozkladu mastných kyselin tvoří odpadní látky (ketolátky), nejčastěji aceton.

Lidské tělo tedy může přijímat glukózu potravou v podobě jednoduché glukózy nebo složitějších disacharidů a polysacharidů. Omezené množství glukózy (150–400 g) lze získávat z glykogenu uloženého v játrech a ve svalstvu. V nejnutnějších a výjimečných případech je možné glukózu opatřit glukoneogenezí z aminokyselin.

Ideální hladina krevního cukru v lidském těle se udává v rozmezí od 3,5 mmol/l do 5,5 mmol/l a je neustále hormonálně regulována. Hormonem sloužícím ke snižování glykémie je inzulin, jehož působením vzniká z glukózy glykogen, který se ukládá. Opačným dějem je glykolýza aktivovaná hormony glukagonem, adrenalinem a noradrenalinem za vzniku molekuly energie ATP. Neschopnost organismu správné regulace hladiny glykémie indikuje onemocnění. [1] [2] [21]

### 1.1.2 Diabetes mellitus

Vysoká hladina glykémie v krvi (hyperglykémie) je ukazatelem onemocnění diabetes mellitus, též zkráceně cukrovka, která je diagnostikována při naměřené hladině glykémie nad 7,0 mmol/l s dalším možným rozvinutím onemocnění, nejčastěji ke kardiovaskulárním komplikacím. Rozlišují se dva základní typy cukrovky, typ I a typ II, lišící se příčinou zvýšeného množství krevního cukru.

Cukrovka prvního typu je dána genetickou predispozicí a k jejímu projevu dochází již v dětském věku. Za zvýšenou hodnotu glykémie může destrukce  $\beta$ -buněk Langerhansových ostrůvků slinivky břišní, které za normálních okolností tvoří hormon inzulin. Kvůli absenci hormonu tak nemůže dojít ke snížení krevního cukru. Člověk trpící tímto tzv. inzulindependentním typem cukrovky je odsouzen k celoživotnímu podávání inzulinu.

Druhý typ cukrovky se obvykle objevuje typicky u starších lidí a je daleko rozšířenější než typ I. Jedná se o poruchu inzulinové rezistence, kdy se inzulin sice vytváří v  $\beta$ -bunčkách Langerhansových ostrůvků, ale v menším množství a metabolismus těla na něj nereaguje. Tato non-inzulindependentní forma může vést k vysokému krevnímu tlaku (hypertenzi) a obezitě.

V některých případech dochází k propuknutí DM v těhotenství jako následek metabolických změn v organismu. Projevuje se kolem 20. týdne těhotenství a po porodu odeznívá s tím, že žena má do budoucna větší předpoklady k propuknutí DM druhého typu. [2] [9] [21]

## 1.2 Měření glykémie

Z důvodu stále většího výskytu poruch glykémie je zapotřebí zajistit její co nejvíce přesné, popřípadě kontinuální změření. V současnosti existuje nepřeberné množství invazivních i neinvazivních postupů, jak lze hodnotu krevního cukru v krvi zjišťovat. Většina z nich se ale již nepoužívá z důvodu nepřesnosti nebo nepraktičnosti. V některých případech je možná i kontinuální monitorace. V tomto odvětví je nejvíce rozšířena možnost napojení na infuzní pumpu, která ve spojení s kontinuálním monitorováním glykémie dodává člověku inzulin samočinně dle potřeby.



### 1.2.1 Neinvazivní metody

Nejstarší neinvazivní metodou hodnocení glykémie je analýza moči, která dnes již nesplňuje podmínky pro správné hodnocení glykémie z důvodu nedostatečného měřicího rozsahu. Ten by měl správně dosahovat hodnot od 1 mmol/l po 30 mmol/l. Navíc se u člověka glukóza v moči objevuje až při hodnotách přesahujících 10 mmol/l, což pro správnou monitoraci hyperglykémie nestačí. Jediným přínosem může mít v případě preventivního screeningu, kdy je zjišťována glukózová tolerance nebo cukrovka.

Neinvazivní metoda, která byla poprvé uvedena na trh v roce 2003, využívá elektromagnetické záření z oblasti radiových vln. Na povrchu kůže je umístěn rezonanční obvod RLC, kde kůže simuluje kondenzátor. Nevýhodami metody je dlouhá doba kalibrace (až tři dny) a velká závislost fyziologického stavu lidského organismu na jeho impedanci, což zkresluje celkový výstup z měření.

Přístroj pro měření hodnoty glykémie pracující na principu reverzní iontoforézy lze použít ke kontinuálnímu monitorování. Dominantou systému jsou dvě elektrody, které se přiloží na kůži. Mezi těmito elektrodami probíhá konstantní elektrický proud přivádějící intersticiální tekutinu k povrchu, kde glukóza přechází do hydrogelového polštářku, naplněného glukózooxidázou. V polštářku pak probíhá chemická reakce. Při měření se předpokládá, že lidská kůže je záporně nabitá.

Zajímavým nápadem je možnost zjišťování hladiny glykémie pomocí speciálních kontaktních čoček, jejichž povrch je pokryt kyselinou boritou. Kyselina reaguje se slzami a vytvoří fluoreskující roztok, který po osvětlení modrým světlem zbarví čočku. V závislosti na vzniklé barvě si diabetik podle orientačních hodnot v tabulce zjistí svůj glykemický stav.

Hodnocení glykémie pomocí Ramanovy spektroskopie probíhá na základě oscilací v tekutině, nejčastěji v komorové vodě oka, které zapříčiňují rozptyl světla. Specifita glukózy pro její selektivní zaznamenávání spočívá v tom, že vibrační pásy glukózy jsou ostřejší než třeba vibrační pásy vody. Proto je menší pravděpodobnost zkreslení signálu okolními tkáněmi. Důležitá je doba snímání, která musí být dostatečně dlouhá, aby rozptylový signál měl správný poměr signálu a šumu.

Glukózu můžeme zaznamenávat i prostřednictvím fotoakustické spektroskopie využívající laserový paprsek, klasicky v rozmezí od 1000 do 1800 nm. Laserový paprsek osvětlí kůži, která zareaguje ohřátím a vznikem akustických vln, které jsou zaznamenávány mikrofonom nebo piezoelektrickým snímačem. K selektivitě působení pouze na molekuly glukózy je nejlepší použití laserů o vlnových délkách 1440 nm, 1550 nm a 1680 nm.

Zjišťování koncentrace glukózy je možné i z lidských slin. Sliny jsou prozařovány elektromagnetickým zářením o vlnových délkách 300 až 1000 nm, které prochází přes holografickou mřížku, za níž je detekováno. [3] [5] [7] [21]

### 1.2.2 Invazivní metody

Měřicí metody invazivního charakteru stanovují hladinu glykémie z celé krve, v případě zjišťování hodnoty ze séra nebo plazmy je nutné zajištění antiglykolytické přísady. Před samotným odebráním žilní krve nesmí pacient několik hodin jíst (min. osm hodin), a proto se odběry plánují na ranní hodiny. Krevní testy jsou zaměřeny především na hodnocení glykovaného hemoglobinu (HbA1c), který je považován za nejpresnější prostředek správné diagnostiky hodnoty krevního cukru a nahrazuje dnes již zastaralou metodu glykemického indexu. Každou červenou krvinku lze totiž rozčlenit na osm částí, z nichž právě jedna, označovaná A1c, odkazuje na stav glykémie v rámci několika týdnů nazpět.

V laboratořích při analýze krve je referenční metodou plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií za pomoci izotopové diluce.

Pro tzv. selfmonitoring slouží domácí glukometry umožňující sledování hladiny glykémie kdykoliv během dne. Tyto přenosné přístroje se uplatňují v rámci informativního měření aktuální hladiny glukózy u diabetiků. Důležitým příslušenstvím těchto glukometrů jsou testovací proužky, na které je nanášena krev, získaná prostřednictvím pera s vystřelovací jehličkou. Nejčastějším místem, odkud se krev získává, je bříško prstu.

Pro samotnou analýzu krve existují dvě základní enzymatické metody, fotometrická a elektrochemická, o kterých bude pojednáno níže. [3] [7] [21]

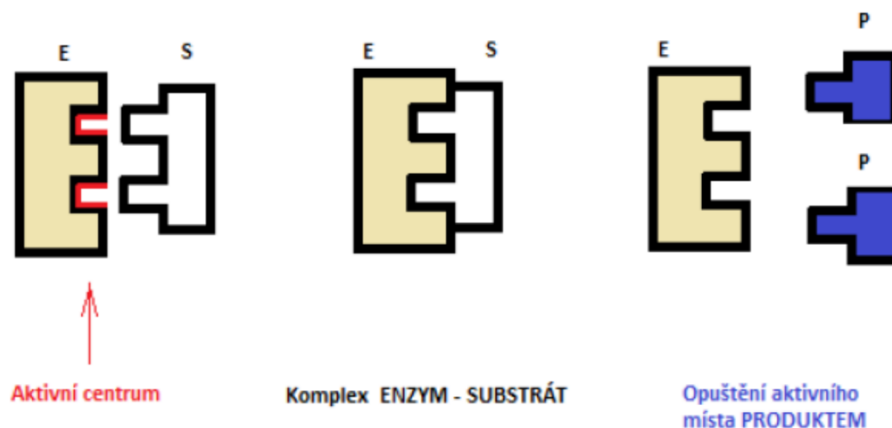


Obr. 2 Glukometr [2]

### 1.2.3 Reakce s enzymy

K urychlení chemických reakcí probíhajících při vyhodnocování glukózy se využívají enzymy. Takto urychlená reakce se nazývá katalýza a enzym při ní dokáže snížit energii, která je pro nastartování reakce potřeba. K aktivaci dochází po styku enzymu a molekuly substrátu (v tomto případě je substrát glukóza) a vytvoří se tzv. komplex enzym-substrát. Výsledkem reakce je pak výchozí enzym a produkt.

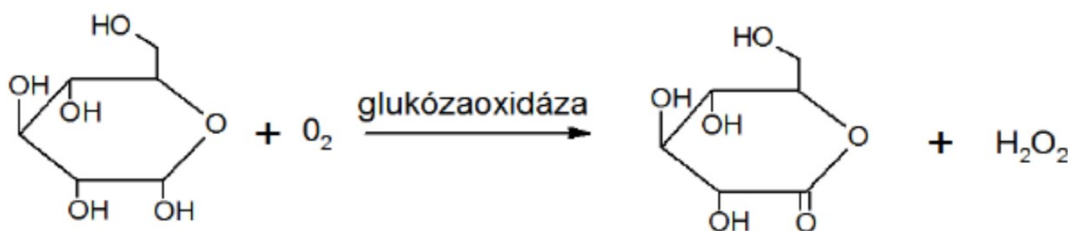
Enzym je původem bílkovina mající schopnost katalytické aktivity. Jeho povrch určený k navázání substrátu je hákovitě řasený tak, aby do něj odpovídající substrát správně zapadl. Geometrické útvary na povrchu enzymů se nazývají haptofory a jev, při kterém do sebe substrát a enzym zapadá, se označuje jako „klíče a zámky“. Na příslušných plochách enzymu a substrátu spojených tímto jevem probíhají všechny katalytické reakce. Vliv na průběh všech reakcí mají teplota, tlak a pH prostředí. [1] [6] [12] [16]



Obr. 3 Komplex enzym-substrát [6]

#### 1.2.4 Fotometrické měření

Tzv. Trinderova metoda je starší způsob zjišťování hladiny cukru v krvi. Chemickou přeměnu katalyzuje enzym glukózooxidáza, která vstupuje do reakce s glukózou a kyslíkem za vzniku glukonátu a peroxidu vodíku, který se dále katalyzuje enzymem peroxidázou na barevný produkt, chromogen tmavě červené barvy. Prostřednictvím reflexní fotometrie se vyhodnotí intenzita výstupní barvy. V současnosti se toto stanovení používá k vyhodnocování glukózy z moči prostřednictvím lakmusových indikátorových papírků. [2] [3] [21]



Obr. 4 Glukózo-oxidázová reakce [21]

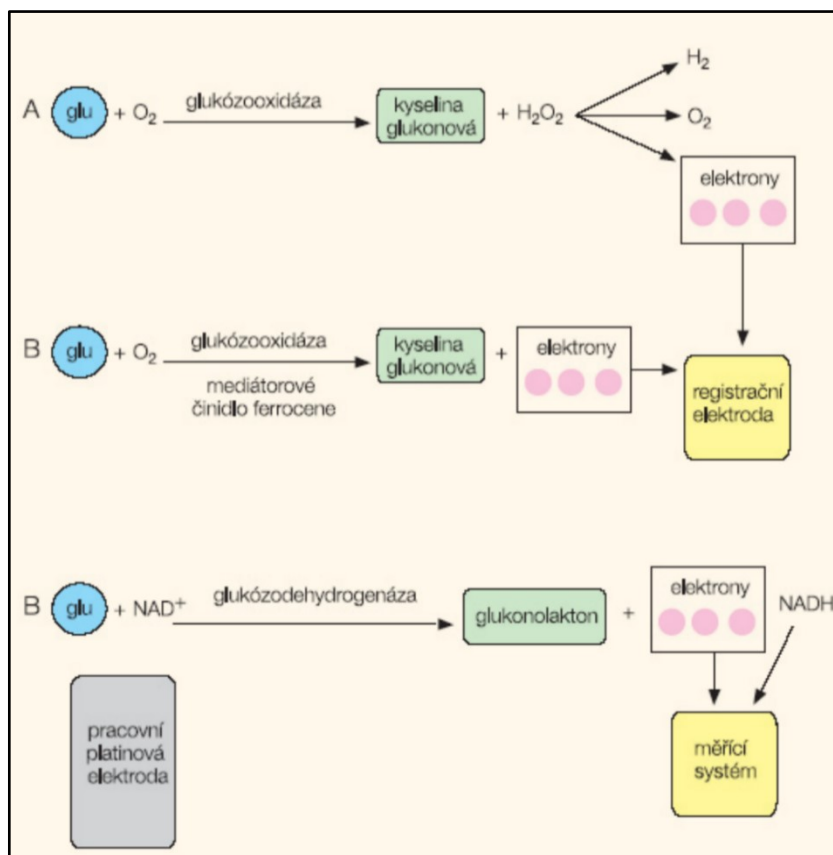
#### 1.2.5 Elektrochemické měření

Novější a v současnosti nejpoužívanější metoda hodnocení glykémie používá elektrochemické senzory. V rámci této metody je možné použití různých enzymů pro katalytické reakce.

Nejstarším enzymem používaným pro tento typ měření je glukózooxidáza. Ta katalyzuje chemickou reakci glukózy s kyslíkem a vzniká kyselina glukonová a peroxid vodíku, který je redukován elektrochemickým dějem na vodu a volné elektrony, díky nimž dochází ke vzniku slabého elektrického proudu, přímo úměrného koncentraci glukózy. Zkreslení tohoto měření spočívá v zapojení kyslíku do reakce jako jejího produktu z peroxidu vodíku (viz obr. 5 A). Z důvodu tvorby nežádoucího kyslíku byla metoda modifikována prostřednictvím mediátorového činidla ferrocene, díky němuž nevzniká při katalýze peroxid vodíku (viz obr. 5 B1).

Novým enzymem určeným pro katalýzu glukózy je glukózodehydrogenáza. Při katalytické reakci aktivované tímto enzymem vzniká glukonolakton a NADH. Nikotinamidadenindinukleotid (NADH) odpovídá koncentraci glukózy. Měření pomocí glukózodehydrogenázy probíhá také bez

zkreslujícího kyslíku a ve velkých laboratorních přístrojích je možné i její fotometrické vyhodnocení (viz obr. 5 B2). [2] [3] [21]



Obr. 5 Reaktanty a produkty chemických reakcí [3]

### 1.3 Měřicí biosenzory

Biosenzor je specifický přístroj, určený pro analýzu zkoumaného vzorku až na molekulovou úroveň. Obsahuje citlivý prvek biologického původu, který napomáhá svou selektivitou získat potřebnou informaci o analytu.

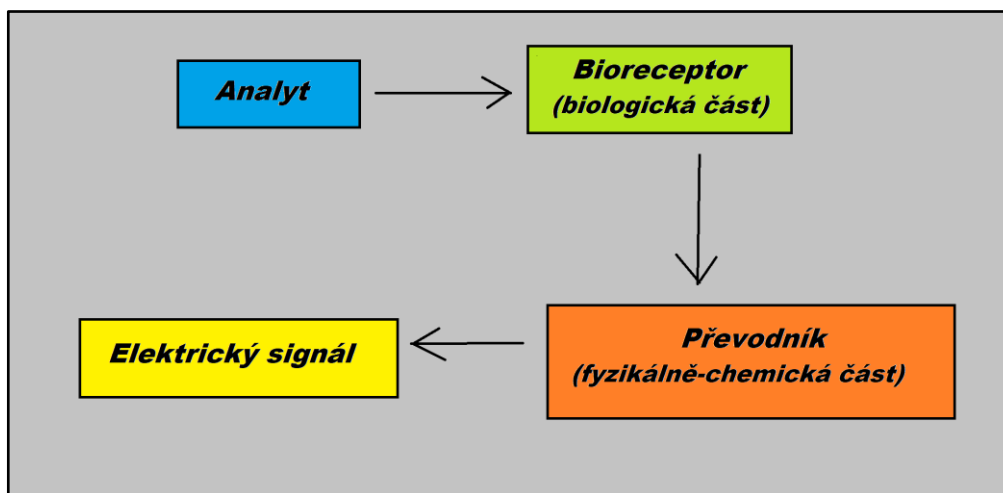
Za první návrh biosenzoru je považována glukózo-enzymová elektroda, zkonstruovaná vědci Clarkem a Lyonsem v roce 1962. Elektrodotový systém měřil spotřebu kyslíku při chemické reakci glukózy za přítomnosti glukózooxidázy, která byla umístěna mezi platinovou elektrodou a její jednoduchou membránou.

V roce 1974 pak společnost Yellow Springs Instrumens uvedla na trh první biosenzor založený na Clarkově elektrodě. Senzor dokázal měřit hodnotu glukózy z plné krve a jeho součástí byla speciální selektivní membrána, která dokázala zadržet rušivé látky vedoucí ke zkreslení. Takovýto senzor můžeme nazývat senzorem první generace.

Výsledkem snahy o eliminaci vzniku peroxidu vodíku při chemické reakci glukózy aktivované glukózooxidázou byly senzory druhé generace. Do chemické reakce byl přidán tzv. mediátor, který přenášel místo kyslíku elektrony od povrchu elektrody k aktivnímu povrchu enzymu. Jako mediátor byl použit ferrocene nebo ferrikyanid. Na elektrodě se touto úpravou také snížilo napětí.

Mezi biosenzory třetí generace patří takové, které nepotřebují pro přenos elektronů mezi povrchy enzymu a elektrody kyslík ani mediátor (přímý přenos elektronů). Konstrukční řešení těchto biosenzorů je velmi náročné a úspěšnost sestavení takového senzoru zatím velmi nízká.

Celý měřicí systém současných biosenzorů se skládá z biologické části tvořené citlivým biologickým prvkem a z fyzikálně-chemického převodníku, který je v jejím těsném kontaktu nebo je její součástí. [5] [10] [15] [18] [20] [22]



Obr. 6 Konstrukce biosenzoru

### 1.3.1 Rozdělení podle bioreceptoru

Jako bioreceptorový prvek mohou být použity např. enzymy, protilátky nebo bílkoviny. Podle zvoleného typu biočidla tak lze dělit biosenzory do čtyř skupin: biokatalytické, DNA, biomimetické a imunosenzory.

DNA senzory jsou tvořeny předem definovanou sekvencí polynukleotidového řetězce, který je imobilizován na pevný nosič. Po vložení senzoru do roztoku s neznámou DNA nebo RNA dojde k párování komplementárních bází a detekci neznámé nukleové kyseliny. DNA senzory se využívají v laboratořích pro analýzu potravin, diagnostiku onkogenů a genetických vad a jsou velmi citlivé také pro detekci mikroorganismů (salmonella, Escherichia coli, ...).

Biomimetické senzory se od ostatních druhů liší svým syntetickým původem. Tento původ zajišťuje pro umělý receptor podstatně vyšší stabilitu a selektivitu než senzor přírodního původu a při cenovém porovnání je i finančně výhodnější. Mezi umělé senzory patří např. oligosacharidy, peptidové nukleové kyseliny nebo syntetické polymery a enzymy.

Imunosenzory jsou specifické tvorbou termodynamicky stabilního komplexu vzniklého po reakci antigenu s protilátkou, chemoreceptorem nebo nukleovou kyselinou. Jsou proto velmi selektivní a citlivé.

Posledním typem biosenzoru je biokatalytický, který má nezastupitelný význam v této diplomové práci. Základem bioreceptoru je jeden nebo více enzymů, díky nimž dochází v analytu k chemickým reakcím. K nejběžněji používaným senzorům patří oxidázy a dehydrogenázy. [14] [17] [19]

### 1.3.2 Rozdělení podle fyzikálně-chemického převodníku

Pro správné vyhodnocení měřeného vzorku je nutné zvolit příslušný převodník, díky kterému získáváme konečný výstup z celého měření. Biosenzory je tak možné používat ve spolupráci s převodníky elektrochemickými, optickými, piezoelektrickými (akustickými) a kalorimetrickými.

Piezoelektrické převodníky se používají převážně ve spojení s imunosenzory. Pracují na principu klasického piezoelektrického jevu, díky kterému se po zapojení piezoelektrického krystalu do elektrického obvodu začnou vytvářet vibrace na frekvenci oscilujícího obvodu. Postup funguje i v obrácené posloupnosti. Pokud akustické vlny dopadají na piezoelektrický krystal, je generováno elektrické pole o stejné frekvenci.

V průběhu enzymatických chemických reakcí dochází ke změně teploty, měřené pomocí kalorimetrického převodníku, který je tvořen termistorem. Kalorimetrický převodník je nutné zkompletovat s náročným přístrojovým vybavením, které by dokázalo sledovat změny teploty v rozlišení 0,000 1 °C.

Optický převodník funguje na principu interakce chemické látky se světelným zářením. Proto je důležité, aby měl takový převodník zdroj světla ve formě laseru, výbojky, lampy nebo světlo emitující diody a detektor, který bude světelné záření řízené pomocí optického vlákna ze zdroje detekovat a měřit intenzitu emise nebo absorpce.

Nejznámějšími a nejpoužívanějšími převodníky jsou elektrochemické, které se dále dělí na konduktometrické, potenciometrické a amperometrické.

Konduktometrické převodníky detekují vzorek na základě jeho schopnosti vést elektrický proud. Sledují se proto změny vodivosti během biochemické reakce.

Základním principem při měření prostřednictvím potenciometrických převodníků je detekce změny potenciálu, která je vyvolána nahromaděním elektrického náboje na rozhraní elektroda-roztok. Měří se změna koncentrace iontů pomocí tzv. iontově selektivních metod (ISE). Elektroda může být konstruována jako samostatná skleněná (pH elektroda) nebo s přídavnými membránami ze silikonového kaučuku či teflonu. V současné době se vyrábí i potenciometrické senzory, jejichž princip vychází z tranzistorů řízených polem (IS-FET). Jejich výhodou je možnost fungování i v nakloněné poloze z důvodu absence vnitřního elektrolytu.

Amperometrické převodníky detekují signál vzniklý elektrochemickou reakcí, během které je dodáváno konstantní napětí pracovní elektrodou. Vzniklý proud přímo úměrně indikuje koncentraci analytu ve zkoumaném vzorku. Tyto převodníky jsou převážně používané ve spojení s enzymy, jejichž produkty z katalytických reakcí ve formě nejčastěji peroxidu vodíku zaznamenávají. Kombinace biosenzoru s amperometrickým převodníkem zaručuje rychlou odezvu, citlivost a dobrou selektivitu vybrané látky. [8] [15] [18] [20]

### 1.3.3 Materiály pro biosenzory

Mezi nejběžnější referenční elektrody pro měření patří kalomelová a chloridostříbrná. Základem pro kalomelovou elektrodu je rtuť, pokrytá vrstvou chloridu rtuťného ( $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ) v nasyceném roztoku chloridu draselného (KCl). Chloridostříbrná elektroda je tvořena stříbrným drátkem, který je pokryt vrstvou chloridu stříbrného a je také ponořen do nasyceného roztoku KCl.

Jako materiál pro pomocné elektrody se vybírají dobře vodivé materiály. Elektroda musí mít dostatečně velkou plochu a nesmí být elektrochemicky aktivní. Dobrým materiálem pro konstrukci takové elektrody je platina v podobě drátku či plíšku.

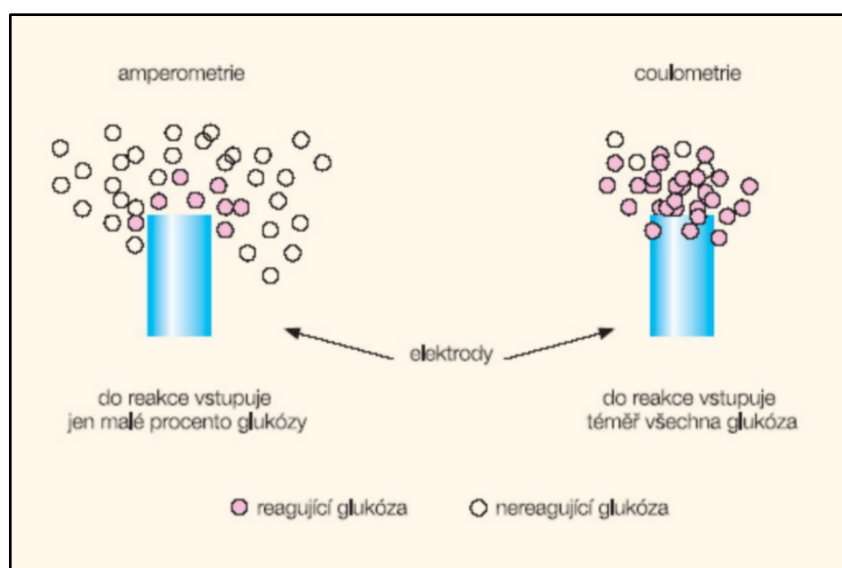
Pro elektrody pracovní je vhodné použít materiál z ušlechtilého kovu (měď, stříbro, zlato, ...), skelný uhlík nebo jiné heterogenní uhlíkové materiály (CPE a SPE). [4] [14] [19]

### 1.3.4 Vyhodnocení glukózy

Předem stanovené množství krevního vzorku se za doby rozvoje glukózového vyhodnocování podstatně snížilo. Před více než 50 lety bylo nutné obstarat 100 ml krve ke správnému vyhodnocení, v současné době je toto množství sníženo nejčastěji na 1–10 ml v rámci domácího monitorování (některé glukometry i v řádech desetin mililitrů). Toto snížení objemu vzorku je zapříčiněno technických vývojem. Pro určení velikosti elektrického proudu se běžně používá amperometrická metoda, která je ale pomalu vytlačována coulometrickou metodou.

Amperometrická metoda vyhodnocuje množství elektronů v proběhlé reakci. Do reakce ale vstupuje jen menší část celkového počtu molekul glukózy, a proto není výsledek citlivý na objemové změny vzorku krve. Na druhé straně je velmi citlivý na změny ve složení krve.

Coulometrická metoda měří elektrický náboj do naprostého spotřebování zkoumaného vzorku. Elektroforéza má vliv na celý průběh chemické reakce. Do vzorku je dodáván elektrický proud a pak je měřena celková velikost elektrického proudu, která byla využita pro tuto reakci až do eliminace všech molekul glukózy. Metoda nevyžaduje takové množství krve jako amperometrická a je daleko rychlejší. Je citlivá na změny v objemu krevního vzorku a málo citlivá ohledně změn krevního složení. [3]



Obr. 7 Možnosti vyhodnocení koncentrace glukózy [3]

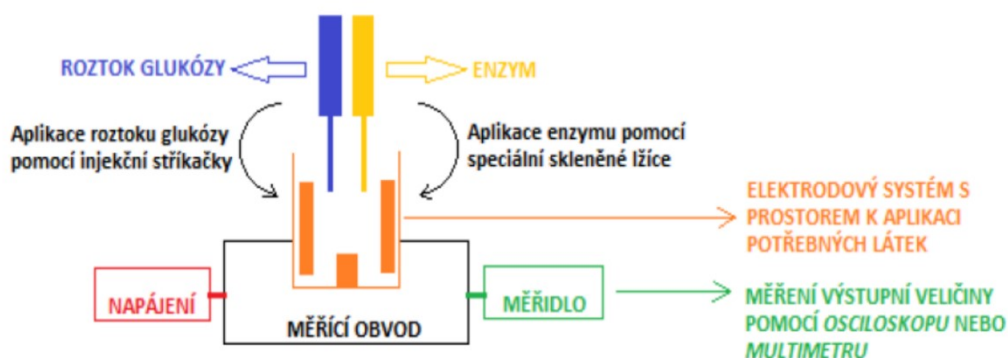
## 1.4 Elektrodotový měřicí systém

Základním kamenem této diplomové práce je kompletní měřicí elektrodotový systém. Skládá se ze tří částí, napájecího obvodu, systému dvou elektrod a měřicího obvodu.

Konceptem je schopnost měření koncentrace glukózy v roztoku obsahujícím buď jen glukózu s destilovanou vodou, nebo i přidaný enzym (glukózooxidázu) pro urychlení katalytické reakce glukózy. Tento enzym způsobí, že měřicí obvod připojený k elektrodotovému systému, ve kterém probíhá biochemická reakce, naměří větší proud než v případě, kdy je měřen pouze samotný roztok glukózy. Vzniklý naměřený signál by měl být přímo úměrný koncentraci glukózy ve vzorku a je generován

pohybem volných iontů v roztoku. Jelikož se ve zkoumaném roztoku nachází ionty různého druhu, je důležité použitím příslušného enzymu vyselektovat pouze molekuly glukózy. Při přidání enzymu k roztoku glukózy dojde k chemické reakci, díky níž vzniká kyselina glukonová a peroxid vodíku, který je nutné pro zvýšení výsledného proudu dále rozštěpit na kyslík, vodík a volné ionty. Aby k takovému rozkladu peroxidu vodíku došlo, je potřeba zajistit v roztoku elektrický potenciál 0,6 až 0,69 V. Z toho důvodu byl napájecí obvod zkonstruován tak, aby mohl daný potenciál zaručit. Vzniklý elektrický proud z chemické reakce je detekován elektrodovým systémem a v měřicím obvodu, ke kterému je systém elektrod připojen, je dále převeden na elektrické napětí umožňující lepší vyhodnocení celkové koncentrace glukózy. Nabitými částicemi souvisejícími s elektrickým proudem, který je měřen na referenční elektrodě, jsou vlastně protony vodíku z molekul peroxidu vodíku.

Jelikož elektrodový systém snímá malý elektrický proud, tak se tento obvod může považovat za mikroampérmetr, a protože se prostřednictvím celého systému detekuje koncentrace glukózy v roztoku, tak je principem vyhodnocení konduktometrie, tedy měříme vodivost. [6]



Obr. 8 Elektrodový měřicí systém [6]

#### 1.4.1 Konstrukce elektrodové části

Dominantou elektrodového systému je soustava elektrod. Tyto elektrody jsou konstrukčně řešeny jako dva malé válečky, propojené spojovacími drátky s pinheady a napájecím a měřicím obvodem. Elektrody jsou upevněny v silikonové hadičce a každá má jinou funkci, danou propojením drátků s pinheady a umístěním pinheadů do obvodu. V předchozí práci, na kterou je navázáno, byly vyzkoušeny dvě možnosti elektrod lišící se průměrem elektrod a jejich rozmístěním v silikonové hadičce. Vzhledem k výstupu experimentu s oběma elektrodami je zde popsán ten s lepšími výsledky.

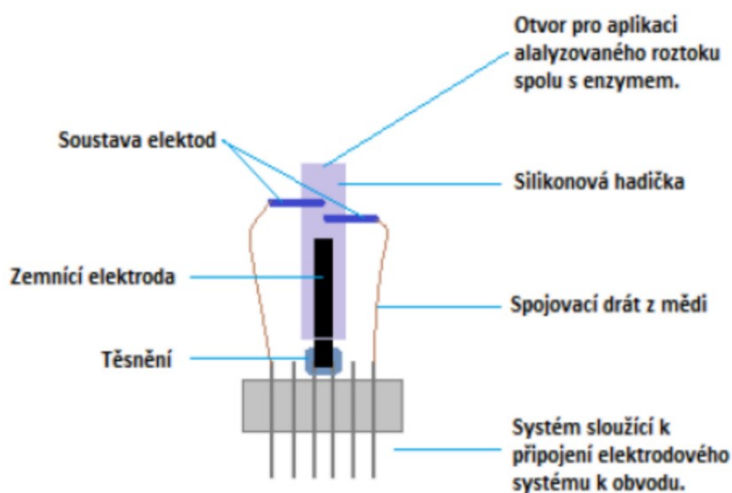
Elektrody v podobě kovového válečku mají tedy průřez 0,5 mm a délku 4 mm. Rozměr vzdálenosti elektrod od sebe je 0,97 mm. Na jednu elektrodu je přiváděno napětí 0,6 – 0,69 V, protože tento potenciál je důležitý pro rozklad peroxidu vodíku vzniklého reakcí glukózy a enzymu. Elektroda je propojena s napájecí částí měřicího obvodu a nazývá se pracovní. Štěpením peroxidu vodíku dochází k rozkladu a vzniklé volné ionty se pohybují jako elektrický proud ke druhému kovovému válečku, měřicí elektrodě, která ho registruje. Spojovací drát mezi měřicí elektrodou a pinheady zajišťuje odvod naměřeného malého proudu do měřicího obvodu, kde probíhá zpracování v podobě převodu na elektrické napětí.



Silikonová hadička, která propojuje všechny komponenty elektrodového systému a zároveň je místem nanášení zkoumaného roztoku, je tvořena silikonem, který je elektricky nevodivý, a tak nehrozí jakýkoli vliv na správnou funkci systému a na chemickou reakci glukózy a enzymu. Průměr hadičky je rovný 4 mm a velikost prostoru na aplikování vzorku je  $25,13 \times 10^{-8} \text{ l}$ . Hadička obsahuje v horní části dvě díry pro umístění elektrod a její dolní část je utěsněna zemnicí elektrodou, která má za úkol odstranit rušení měřicího systému.

Zemnicí elektroda je zkonstruována jako soustava drátků v izolantu a je tvořena ze stejného materiálu jako spojovací drátky, tedy z mědi. Její koncové části jsou propojeny s dvěma vývody pinheadů, připojenými k obvodu. Pro utěsnění elektrody byla vybrána směs používaná v tyčinkách tavných pistolí (směs syntetických pryskyřic, parafínů a kopolymeru).

Spojovací drátky jsou propojovacím článkem mezi pozlacenými elektrodami a pinheady. Jeden přivádí na pracovní elektrodu potřebné napětí pro rozklad peroxidu vodíku a druhý vede detekovaný signál z měřicí elektrody do obvodu. Pinheady tvoří dvouřadý systém se šesti vývody, sloužícími ke spojení s měřicím obvodem. [6]



Obr. 9 Elektrodový systém [6]

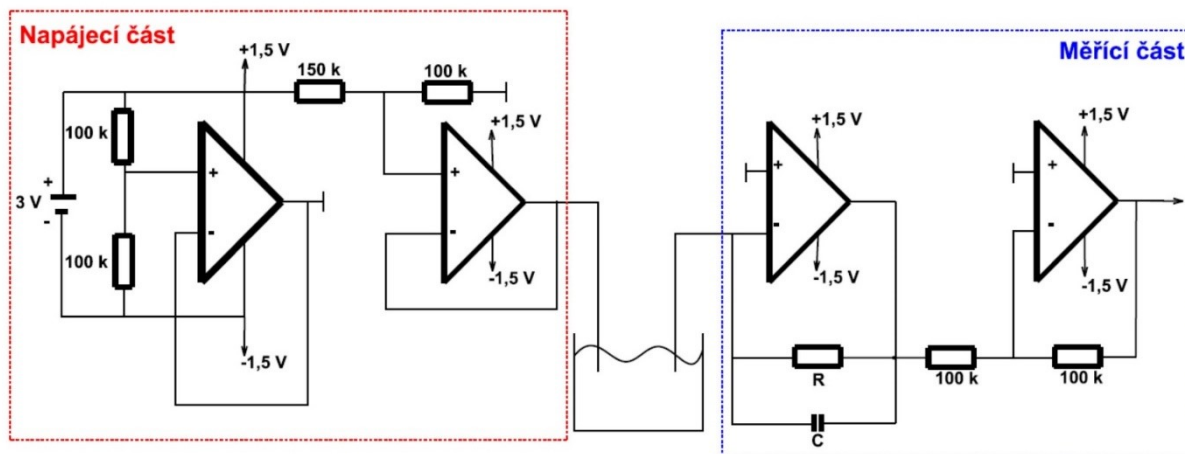
#### 1.4.2 Měřicí a napájecí obvod

Obvod připojený k soustavě elektrod lze rozdělit na dvě části, část napájecí a část měřicí. Úkolem obvodu je přivádění napětí ze zdroje upravit tak, aby na pracovní elektrodu elektrodového systému bylo přivedeno napětí 0,6 V, a následně z měřicí elektrody zpracovat malý elektrický proud a převést ho na napětí, které je měřeno pomocí osciloskopu nebo multimetru. Operační zesilovače typu chopper pracují v rozsahu napájecího napětí a jsou důležité pro vyrovnání napěťové nesymetrie svých vlastních vstupů.

Do první části, napájecí, je přivedeno ze zdroje stejnosměrné napětí rovné 3 V, realizované dvěma tužkovými bateriemi (AA), zapojenými do série. Napětí je vedeno přes napěťový dělič v podobě dvou rezistorů o hodnotě 100 k $\Omega$ , který napětí sníží na 1,5 V a vede ho do kladného vstupu operačního zesilovače, jehož funkcí je sledování hodnoty napětí. Napětí na výstupu operačního zesilovače je tedy stejné jako na jeho vstupu. Z výstupu operačního zesilovače je vytvořena umělá zem. Napětí je v obvodu dále upraveno dalším napěťovým děličem s hodnotami odporu 150 k $\Omega$  a 100 k $\Omega$ . Hodnota napětí

vstupujícího na kladný vstup druhého zesilovače je tak závislá na poměru odporového děliče a na velikosti napájecího napětí. Na kladný vstup druhého operačního zesilovače, realizovaného opět jako sledovač napětí, je tudíž přivedeno napětí 0,6 V. Tato upravená hodnota napětí je vedena na pracovní elektrodu elektrodového systému pomocí spojovacího drátku a pinheadu připojeného k obvodu.

Druhá část obvodu je nazývána měřicí z důvodu její funkce a spojení s měřicí elektrodou. Třetí operační zesilovač má funkci převodníku proudu na napětí tak, že jeho výstupní napětí je závislé na hodnotě odporového trimru, odporu roztoku, ve kterém jsou ponořené elektrody, a na vstupním napětí na pracovní elektrodě. Kondenzátor ve schématu slouží k vyfiltrování náhlých a rychlých změn úrovně napětí z okolního prostředí během měření. Ze třetího operačního zesilovače tak vystupuje záporný úbytek napětí. Záporné napětí je upraveno čtvrtým operačním zesilovačem, sloužícím jako invertor signálu. Nedochází tu k žádnému zesílení a výstupem je napětí o totožné hodnotě, ale s opačným znaménkem. Výsledné kladné napětí na konci měřicího řetězce může být vyhodnoceno měřicím prvkem, který zobrazuje hodnotu napětí úměrnou koncentraci glukózy v měřeném roztoku. [6]



Obr. 10 Schéma zapojení součástek původního obvodu [6]

## 2 Návrh a realizace HW řetězce pro on-line záznam měřených dat z elektrod

Úkolem práce je vytvoření kompletního měřicího a zobrazovacího elektrodového systému, schopného sledovat na obrazovce počítače hodnotu výsledného napětí odkazujícího na koncentraci glukózy. Takový systém musí být složen ze senzoru, obvodů pro úpravu signálu a prvků pro připojení k počítači vhodným komunikačním rozhraním. V počítači by pak mělo probíhat vyhodnocení měřeného signálu prostřednictvím vybraného programového vývojového prostředí.

Obvody počítačového rozhraní mohou být rozděleny podle různých kritérií. Za základní rozdělení lze považovat způsob propojení, drátové s propojovacími kabely a bezdrátové, k nimž patří rozhraní IrDA nebo Bluetooth. Podle druhu signálu je možné počítačové vstupy a výstupy dělit na analogové a digitální. Komunikace mezi počítačem a měřicím přístrojem probíhá jednostranně i oboustranně dle potřebné funkčnosti systému.

Za nejznámější rozhraní je považována univerzální sériová sběrnice (USB), která umožňuje připojit k počítači velkou škálu zařízení a téměř veškerou periférii.

Při realizaci propojení elektrodového měřicího systému s počítačem je nejvhodnější začít na výstupu předchozí práce. To znamená, že se musí vzít v potaz druh výstupního signálu z měřicího obvodu. Měřicí obvod upravil malý elektrický proud, registrovaný měřicí elektrodou, na elektrické napětí, které se nachází na výstupu obvodu. Z faktu o použitém zdroji elektrického napájení, jímž jsou dvě tužkové baterie zapojené do série, je evidentní, že vzniklý výstupní analogový signál je malé stejnosměrné napětí. [6] [16]

Tento signál je možné upravit a zpracovat několika způsoby.

### 2.1 Přímé napojení pomocí měřicí karty

Nejjednodušší a nejčastější volbou pro převodní prvek určený k tzv. přímému měření je použití karty pro sběr dat (DAQ – Data Acquisition). Výběr vhodné měřicí karty závisí na konkrétní úloze, pro kterou by měla být určena. Jejími nejdůležitějšími vlastnostmi jsou možné měřicí funkce, jako např. analogové vstupy, analogové výstupy, digitální linky a čítače nebo časovače. Pokud má karta více než jednu z těchto funkcí, lze ji nazývat kartou multifunkční.

Karty se dají dělit podle použité sběrnice. Protože je u osobních počítačů rozšířená sběrnice PCI, tak tato sběrnice převládá i u měřicích karet. Sběrnice PXI je volena u výkonnějších systémů a pomocí speciálních vodičů pro přenos časování umožňuje i synchronizaci několika měřicích karet a tím vytváření velkých systémů s řízením pohybu a zároveň i se snímáním obrazu. Pro průmyslové využití se také vyrábějí měřicí karty pro sběrnici ISA. V současné době se čím dál častěji zavádějí do praxe externí měřicí karty připojované do počítače přes sběrnice USB nebo FireWire.

Pro správný výběr karty je vhodné vzít v potaz nejenom sběrnici a funkční vlastnosti karty, ale i jednotlivé parametry těchto funkcí. Pro analogové vstupy jsou těmito parametry jejich počet, vzorkovací frekvence, rozlišení a rozsahy napětí. V principu je důležité poznat rozdíl mezi kvalitními a méně kvalitními kartami, kdy u lepších karet je k dispozici většinou více parametrů jednotlivých funkcí. Například u parametru rozlišení, který odpovídá použitému A/D převodníku, je často uváděn jen počet bitů, popřípadě přesnost. Informace ke kvalitnějším kartám obsahují navíc třeba i jednotlivé

složky chyb, jako např. offset nebo šum daný vybraným rozsahem. Významným parametrem je i závislost těchto chyb na teplotě.

Je také důležité počítat s tím, že se rozlišení, které je u karty udávané, může značně lišit, a to na základě ostatních zařazených obvodů. V současné době jsou stále častěji používanými karty šestnáctibitové. Ošemetný může být i parametr maximální vzorkovací frekvence. Některé karty totiž na jeden A/D převodník přepínají všechny své vstupy. Pokud má tedy například měřicí karta maximální vzorkovací frekvenci 100 kHz a měření probíhá z deseti kanálů, tak je v rámci měřicí úlohy získáno z každého kanálu ve skutečnosti jen 10 000 hodnot za sekundu. Mezi jednotlivými kanály může dojít i ke zpoždění minimálně v řádu jednotek. Pokud má ale karta pro každý kanál určen vlastní vstupní zesilovač a A/D převodník, k těmto odchylkám nedochází. Filtr typu dolní propust na vstupu každého kanálu může navíc přikazít porušení vzorkovacího teorému a vzniku anti-aliasingu. Důležitým parametrem při výběru karty jsou napěťové rozsahy analogových vstupů. Nejenom že měřený signál musí kolidovat s napěťovým rozsahem, ale musí být i tento rozsah dostatečně využit. To znamená, že pokud se měřený signál pohybuje v rozmezí 0 až 2 V, je lepší vybrat kartu s rozsahem 0 až 2,5 V než kartu s rozsahem  $\pm 10$  V. Při použití druhé karty by totiž docházelo až k osmkrát většímu kvantizačnímu šumu.

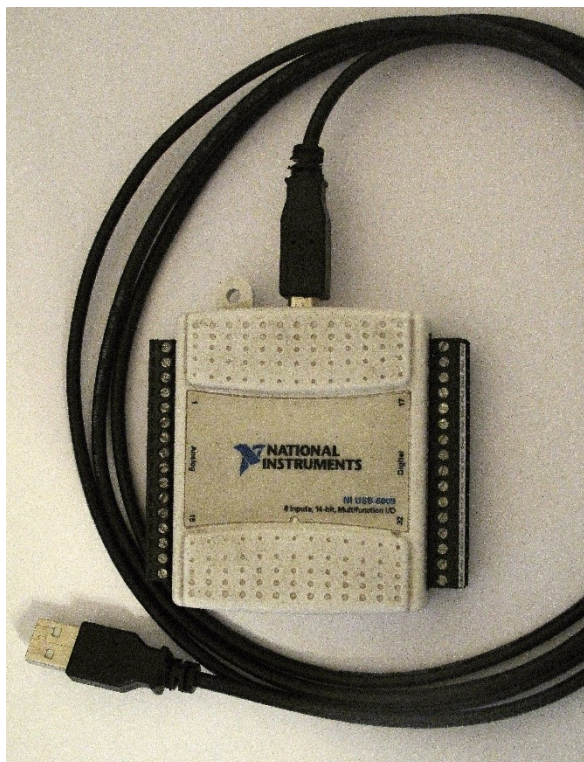
Parametry analogových výstupů jsou totožné s parametry analogových vstupů. U analogových výstupů jsou méně časté přepínatelné napěťové rozsahy.

Digitální linky mohou být buď jednostranné, kdy je směr signálu jasně daný hardwarem, nebo oboustranné, které je možné přepínat pomocí softwaru. Vnitřní obvody těchto linek umožňují omezení zákmitů kontaktů nebo rušivých vstupních impulzů prostřednictvím programovatelných filtrů, nastavení předem definované binární kombinace pomocí časovače (watchdog) nebo detekci změny stavu na vstupech.

Další funkcí měřicích karet může být i čítání a časování. Čítače a časovače se používají pro počítání impulzů nebo dělení frekvencí, pro vytváření signálů s volitelnou frekvencí a v neposlední řadě pro připojení inkrementálních čidel. Důležitým parametrem u čítačů je délka registru. Pokud tedy čítač dojde k maximální hodnotě registru, automaticky dochází k jejímu přetečení a čítač začíná znovu čítat od nuly. Standartní délka registru je 24 nebo 32 bitů. Jedním z parametrů čítače může být i maximální frekvence, kterou dokáže zpracovat. Multifunkční karta má v dokumentaci uvedenu maximální rychlost každé své části zvlášť.

Ke každé měřicí kartě je důležité mít odpovídající ovládací program ve formě programovacího rozhraní v různých jazycích. Oblíbeným ovladačem je NI-DAQmx od firmy National Instruments. Úlohy probíhající pomocí tohoto ovladače jsou rozděleny na několik částí, které se ale vykonávají naráz. O kolizi úloh, ke které by mohlo dojít, se uživatel vůbec nedozví. Pomocí uživateli při tvorbě vhodného programu mohou nejružnější příklady, které jsou dostupné po instalaci ovladače karty nebo na internetu.

Pro přímé měření napětí byla použita v rámci této diplomové práce multifunkční měřicí karta NI USB 4009 od společnosti National Instruments. Tyto karty, které se zapojují do počítače prostřednictvím sběrnice USB, představují systém pro sběr dat, určený k přenosu elektrického signálu do počítače a k jeho následnému zpracování a vizualizaci prostřednictvím programového prostředí LabVIEW. Karta se skládá z osmi analogových vstupů (14-bit), dvou analogových výstupů (12-bit), dvanácti digitálních obousměrných linek a jednoho čítače (32-bit). Analogové vstupy karty je možné zapojit k elektrodovému systému buď diferenciálně, nebo se společnou zemí. Díky knihovně DAQmx v prostředí LabVIEW lze jednoduše komunikovat s měřicí kartou. Všechny dokumenty obsahující podrobné informace o této měřicí kartě jsou na CD, přiloženém k diplomové práci. [14] [16]



*Obr. 11 Multifunkční karta NI USB 4009*

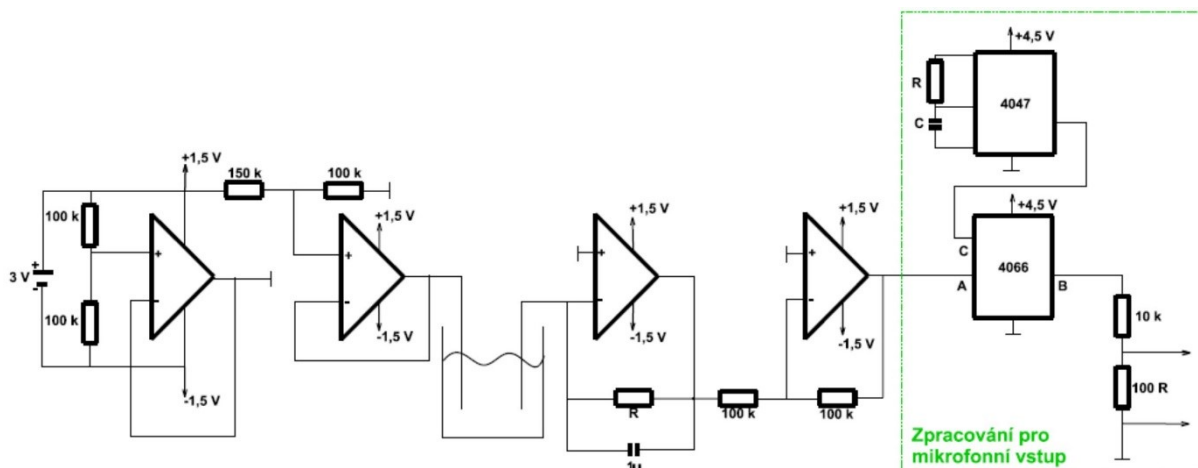
## **2.2 Převodní prvek pro mikrofonní vstup počítače**

Možnou alternativou k měřicí kartě představuje doplněná část součástek do původního obvodu, která zpracovává malý stejnosměrný signál takovým způsobem, aby mohlo dojít k propojení s počítačem. Na výstupu převodního prvku je potřeba získat střídavé napětí, které se patřičným kabelem, zakončeným konektorem jack, zapojí do mikrofonního vstupu počítače, v němž se pomocí A/D převodníku převede na signál digitální.

Celý převodní prvek musí být zkonstruován tak, aby nedošlo k přetížení analogového mikrofonního vstupu majícího citlivost 100 mV. Jeho hlavními částmi jsou dva logické integrované obvody řady 4000. Tyto obvody se vyznačují nízkou spotřebou a vysokou odolností vůči šumu. Jako zdroj elektrického napětí pro obvody CMOS může být použita plochá baterie o hodnotě 4,5 V.

První obvod přidaný do schématu je obvod 4047 obsahující multivibrátor, který může pracovat v monostabilním nebo astabilním režimu. Pro monostabilní režim je charakteristické to, že má jeden stabilní stav, ve kterém může zůstat libovolně dlouhou dobu, a jeden kvazistabilní stav, ve kterém může setrvat pouze přechodně. Astabilní režim, zvolený v tomto případě, se vyznačuje tím, že obvod nemá žádný stabilní stav, a tak se periodicky překlápí z jednoho stavu do druhého.

Druhý obvod 4066 je analogový spínač s nízkým odporem skládající se ze čtyř nezávislých oboustranných spínačů. Mikrofonní vstup v počítači má na vstupu v sérii kondenzátor, a proto nepropustí stejnosměrnou složku signálu vycházející z měřicí elektrody. Tento kondenzátor je součástí RC článku, který je určen k zamezení vstupování vysokofrekvenčního rušení. Je tedy potřeba signál „rozsekat“ na stejnosměrný pulzní signál. K tomu je určen právě elektronický spínač 4066 řízený obvodem 4047, který je v zapojení astabilní klopný obvod.



Obr. 12 Doplněné schéma zapojení s převodním prvkem

Ve výsledném schématu, doplněném o převodní prvek, je signál z výstupu invertoru veden do obvodu 4066 fungujícího jako elektronický spínač. To znamená, že pokud na vstup C dojde z obvodu 4047 logická „1“, tak se vstup A propojí s výstupem B. Vystupující napětí je nutné ještě opět snížit pomocí odporového děliče o hodnotách odporů 10 k $\Omega$  a 100  $\Omega$ . Takto upravený signál může nyní vstoupit do mikrofonního vstupu počítače a podrobit se softwarovému zpracování v programu LabVIEW. [11] [14]

## 2.3 Ověření funkčnosti obvodu

K ověření správného fungování doplněného obvodu, postaveného nejdříve na nepájivém poli, byl použit osciloskop. Při zjišťování funkčnosti se pracovalo s určitými předpoklady, stanovenými na základě výpočtů. Po zapojení všech součástek a propojek mezi nimi byl nejdříve ověřován původní obvod určený pro přímé měření napětí prostřednictvím měřicí karty. Na nepájivé pole byl místo soustavy elektrod doplněn rezistor o hodnotě 600 k $\Omega$  a zároveň byl vyjmut z obvodu kondenzátor, který plní svoji funkci hlavně při měření s enzymem.

Obvod je napájen dvěma tužkovými bateriemi, zapojenými do série. Toto napětí vede ze zdroje na napěťový dělič o hodnotě odporů 100 k $\Omega$ . Hodnota napětí vycházejícího z napěťového děliče a zároveň vstupujícího do neinvertujícího vstupu prvního operačního zesilovače je rovna 1,5 V podle vzorce

$$U_{výst} = U_{vst} \frac{R_2}{R_2 + R_1} \quad (2.1),$$

kde  $U_{výst}$  je výsledné napětí z děliče,  $U_{vst}$  je rovné původnímu napětí a  $R_1$  a  $R_2$  představují hodnoty rezistorů.

Další napěťový dělič o hodnotách odporů 150 k $\Omega$  a 100 k $\Omega$  podle stejného vzorce snižuje napětí na 0,6 V. Toto napětí, které bude vedeno během experimentu na pracovní elektrodu, je důležité pro správný průběh chemické reakce roztoku glukózy.

Podle vzorce

$$I = \frac{U}{R} \quad (2.2)$$



lze snadno vypočítat proud protékající příslušným doplněným rezistorem o hodnotě odporu 600 kΩ, když je známé i napětí 0,6 V. Proud rovnající se 1 μA dále protéká v obvodu přes odporový trimr o nastavené hodnotě 1 MΩ, na kterém dochází k úbytku napětí podle vzorce

$$U = IR \quad (2.3).$$

V případě kondenzátoru byla zvolena časová konstanta  $\tau$  na hodnotu 1 s, a jelikož je známa hodnota odporového trimru, lze dopočítat i hodnotu kondenzátoru, která je rovna 1 μF podle vzorce

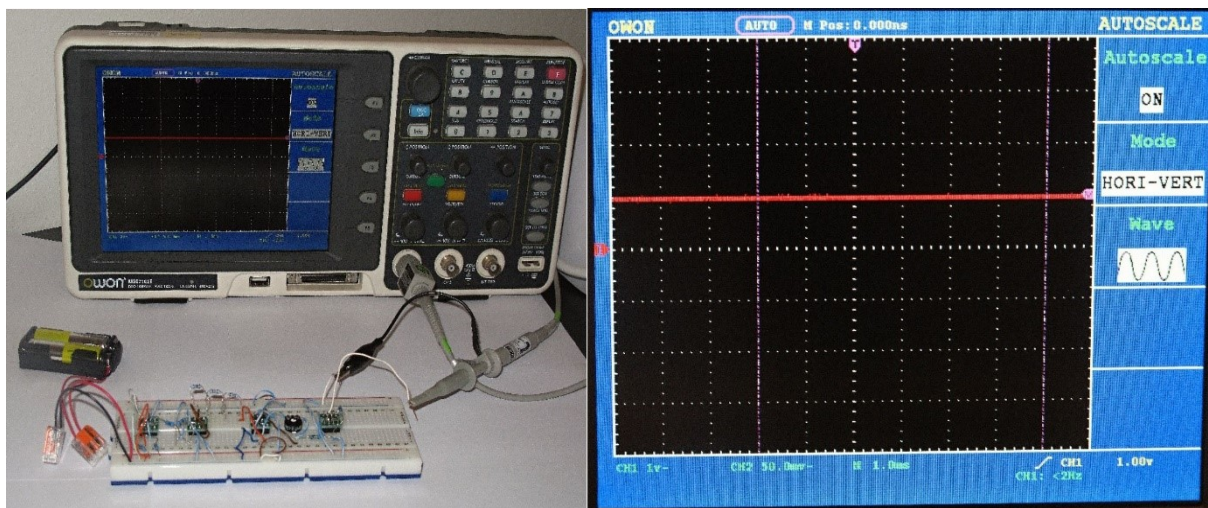
$$C = \frac{\tau}{R} \quad (2.4).$$

Protože operační zesilovač musí udržet napětovou symetrii vlastních vstupů, na jeho výstupu je napětí o hodnotě -1 V. Toto napětí je posledním, čtvrtým operačním zesilovačem, zapojeným jako invertor, převedeno na konečné napětí 1 V podle vzorce

$$U_{výst} = -\frac{R_2}{R_1} U_{vst} \quad (2.5),$$

kde  $U_{výst}$  je napětí vycházející z invertoru,  $U_{vst}$  je vstupující záporné napětí a  $R_1$  a  $R_2$  hodnoty rezistorů.

Výsledné napětí je vidět na obrazovce osciloskopu na obrázku 13.



Obr. 13 Ověření obvodu – 1V

Dále bylo pokračováno v ověřování funkce doplněného obvodu, určeného k napojení do počítače přes mikrofonní vstup. Toto schéma pokračuje dvěma CMOS obvody řady 4000. Obvod 4047 je zapojený jako astabilní klopný obvod. Funkcí takto zapojené součástky je periodické překlápění mezi dvěma stabilními stavy, a tím pádem by na jejím výstupu mělo docházet ke generování obdélníkového signálu. Obvod je napájen napětím o hodnotě 4,5 V a tato skutečnost udává hodnoty i obou stabilních stavů, mezi kterými se překlápí (0 V a 4,5 V). Na osciloskopu by se tedy měl objevit obdélníkový signál, ve kterém dolní mez má hodnotu 0 V a horní hladina dosahuje 4,5 V. Rezistor a kondenzátor u obvodu představují jeho časovací prvky udávající frekvenci výstupního obdélníkového signálu. Pro zpracování signálu v počítači se jeví jako nejvhodnější frekvence 1 kHz, a proto byl RC obvod na tuto hodnotu nastaven. Velikosti odporu a kapacity byly vypočítány ze vzorce uvedeného v datasheetu součástky 4047. Tam je uvedeno, že frekvenci signálu na výstupu OSC OUT je možné vypočítat podle vzorce

$$f = \frac{1}{4,4RC} \quad (2.6),$$

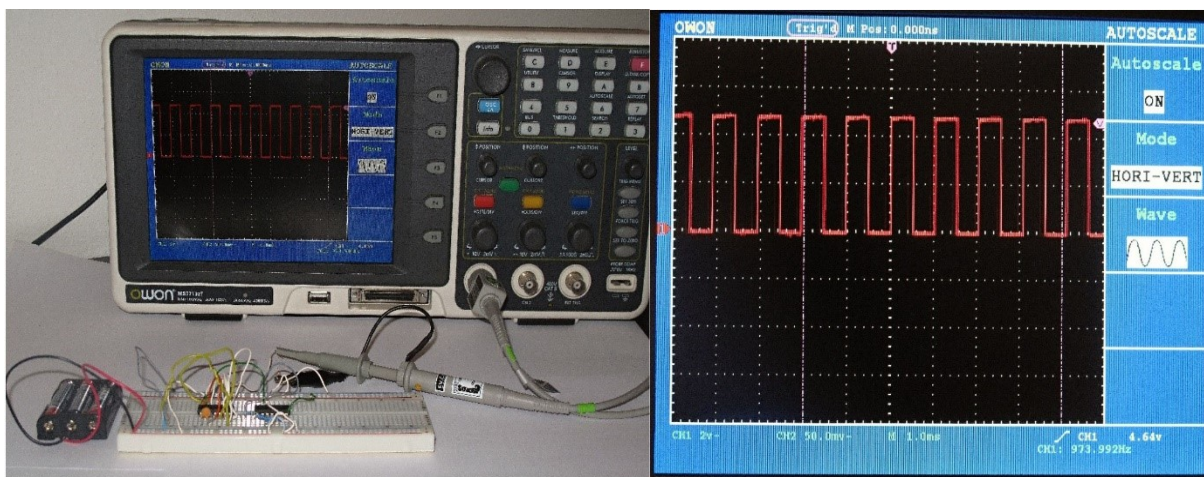
kde  $f$  je frekvence signálu na daném výstupu součástky,  $R$  je hodnota rezistoru a  $C$  hodnota kapacity kondenzátoru.

Člen  $RC$  představuje vlastně časovou konstantu  $\tau$  v sekundách. To je dokázáno rozkladem fyzikálních jednotek pomocí vzorce pro výpočet kapacity z elektrického náboje a napětí

$$RC = R \frac{Q}{U} \left[ \Omega \frac{C}{V} \rightarrow \Omega \frac{As}{V} \rightarrow \Omega \frac{s}{\Omega} \rightarrow \Omega Ss \rightarrow \frac{Ss}{s} \rightarrow s \right] \quad (2.7).$$

Po dosazení zvolené frekvence lze určit hodnoty jednotlivých prvků, v tomto případě byly zvoleny hodnoty součástek rezistoru 240 k $\Omega$  a kondenzátoru 1 nF a výsledná frekvence vychází 947 kHz. Další možností je do obvodu zapojit jeden prvek s pevně danou hodnotou a jako druhý použít prvek s nastavitelnou hodnotou (odporový trimmer + kondenzátor). Po zapojení na osciloskop je možné pak potřebnou frekvenci 1 kHz přesně nastavit postupným snižováním nebo zvyšováním hodnoty odporu trimru. Obvod s použitým odporovým trimrem ale není praktický z dlouhodobého hlediska, protože odporový trimr nemá takovou dlouhodobou odporovou stabilitu jako pevný rezistor.

Na výstupu součástky 4047 by tedy ve finální podobě měl být obdélníkový průběh signálu o hodnotách 0 V a 4,5 V s frekvencí 1 kHz. Toto ověření je možné zhlédnout na obrázku 14, kde jsou vidět předpokládané hodnoty. Určitá nepřesnost u výsledné frekvence je zapříčiněna tolerancí použitých součástek. Zatímco tolerance hodnot rezistoru se pohybuje kolem 1 %, u kondenzátoru je to až 10 % od požadované hodnoty.

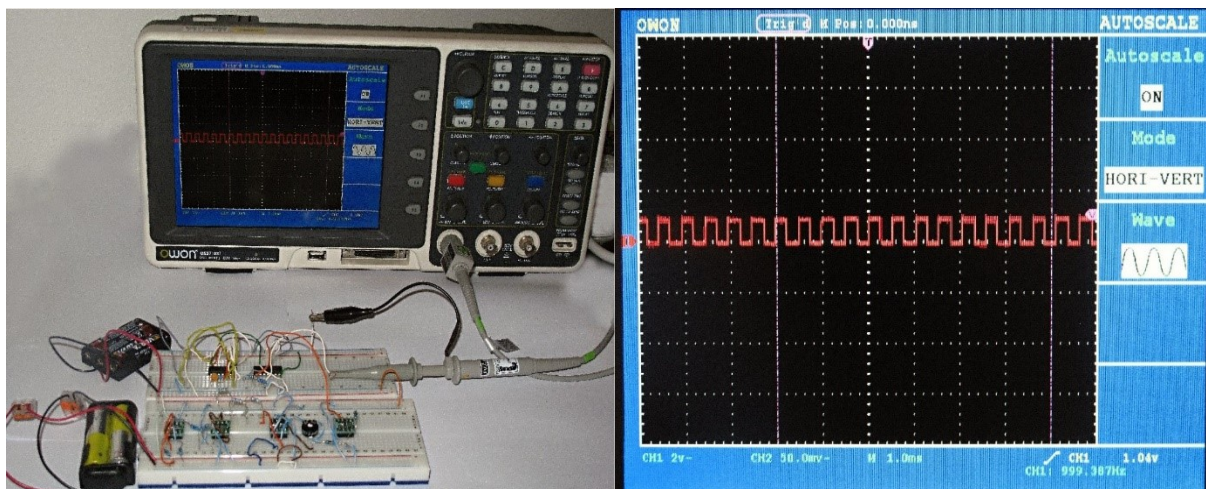


Obr. 14 Ověření obvodu – 4047

Po ověření správné funkčnosti prvního CMOS obvodu bylo postoupeno ke druhému, elektronickému spínači. Ten je napájen stejným napětím jako obvod první, a tak byly z praktického důvodu ve finální podobě zvoleny tři mikrotužkové baterie, zapojené do série. Do druhého CMOS obvodu 4066 vstupuje vytvořený obdélníkový signál z předchozího 4047 a zároveň i signál z posledního ze čtyř operačních zesilovačů původního, již ověřeného obvodu. Do obvodu 4066 tedy mimo napájecího napětí a obdélníkového signálu vstupuje ještě napětí o hodnotě 1 V. Toto napětí 1 V přicházející na jeden ze vstupů udává hodnotu signálu vystupujícího z této součástky. Elektronický spínač je řízen obdélníkovým signálem tak, že v případě došlé horní meze propustí signál – v tomto případě o hodnotě 1 V. V případě dolní meze se spínač rozezne a v tento okamžik tak hodnota 1 V neprochází. Jev je zapříčiněn velkým vzestupem elektrického odporu, který mnohonásobně sníží napětí na vstupu součástky 4066. Ověřený signál vystupující z obvodu 4066 je viditelný na obrázku 15. Je u něj patrné,



jak se signál vystupující z měřicího obvodu v čase mění a skáče z nulové hodnoty na hodnotu 1 V, čehož bylo nutné docílit.



Obr. 15 Ověření obvodu – 4066

Následně je signál ve schématu ještě snížen napěťovým děličem o hodnotách 10 k $\Omega$  a 100  $\Omega$ , aby výsledné napětí mělo dostatečnou hodnotu vzhledem k citlivosti mikrofonního vstupu. V tomto případě podle vzorce na výpočet výstupního napětí napěťového děliče je horní mez výstupního napětí rovna 10 mV, což je při skutečnosti, že citlivost mikrofonního vstupu je rovna 100 mV, adekvátní hodnota. Ke stejnému snížení napětí by došlo i při použití jiných hodnot napěťového děliče, pokud by byly ve správném poměru. Důležité je, aby hodnoty odporů nebyly nižší než 10 k $\Omega$  a vyšší než 10 M $\Omega$ , protože by docházelo k výraznému navýšení rušení z okolního prostředí. Výše popsanými úkony bylo docíleno vzniku pulzního signálu o přiměřené hodnotě, kterou je možné pustit do počítače, aniž by došlo ke znehodnocení.

## 2.4 Realizace obvodu

Obvody pro oba způsoby připojení k počítači byly zpracovány v editoru plošných spojů EAGLE. Byla vytvořena schémata zapojení všech součástek a následně plošný spoj (formát board) pro obvod k napojení měřicí karty, ze kterého byl vygenerován podklad pro výrobu DPS. Ten byl zhotoven na jednostranný plošný spoj a osazen SMD součástkami. Konečné rozhodnutí o výrobě DPS pro měřicí kartu bylo založeno na cvičném experimentálním měření, které ukázalo, že hodnoty naměřené pomocí měřicí karty jsou přesnější. Do DPS byla napájena dutinková lišta, na kterou byla před experimentálním měřením nasazena soustava elektrod (viz níže).

Tab. 1 Seznam použitých součástek

Počet	Součástka	Typ
4x	Operační zesilovač	chopper
5x	Rezistor	100 kΩ
1x	Rezistor	150 kΩ
1x	Odporový trimr	použitá hodnota 1 MΩ (2,5 MΩ )
1x	Kondenzátor	1 μF
1x	Pinheadová řada	2x6
2x	Tužkové baterie (AA)	1,5 V → 3 V

Na základě rozměrů vytvořeného plošného spoje byl vytvořen ochranný kryt, navržený v programu Autodesk Inventor a vytisknutý na 3D tiskárně. Schéma zapojení, parametry součástek, deska plošného spoje a zkonstruovaný návrh ochranného krytu jsou součástí příloh nebo CD diplomové práce. [23]

## 2.5 Vhodné materiály pro elektrodotový systém

Cílem práce bylo ověřit elektrodotový systém s jinými materiály pracovní a registrační elektrody ve formě dvou úzkých drátků. Byly zvažovány možné varianty vhodných vodivých kovů používaných v elektrotechnice a medicínské praxi.

### 2.5.1 Vlastnosti elektrotechnických materiálů

Výsledky měření mohou být z velké části výrazně ovlivňovány výběrem materiálů pro jednotlivé komponenty, ze kterých je navrhovaný systém tvořen. Materiálové vlastnosti jsou dané strukturou vnější vrstvy elektronového obalu atomů prvku tvořícího materiál. Při vzájemném přiblížení atomů spolu elektrony z vnějších vrstev interagují a mezi atomy vznikají vazby. Vlastnosti materiálů jsou dány uspořádáním atomů tvořících tyto vazby.

Kovy jsou charakterizovány vazbou kovovou a lze si je představit jako strukturu kladných iontů, systematicky umístěných v krystalové mřížce, která je obklopená valenčními elektrony přecházejícími mezi atomy. Výskyt těchto volných elektronů zajišťuje vysokou elektrickou a tepelnou vodivost kovů. Interakce elektronů s krystalovou mřížkou a tím vznikající rušení usměrněného pohybu elektronů způsobuje to, že elektrický odpor kovů se zvětšuje s rostoucí teplotou.

K základním vlastnostem vodivých materiálů patří dobrá elektrická a tepelná vodivost, termoelektrické vlastnosti a dobré mechanické vlastnosti s vysokou pružností a plastickou tvárností.

Dle charakteru použití vodivých materiálů je možné rozdělení do dvou kategorií, materiály s vysokou elektrickou vodivostí a materiály s velkým elektrickým odporem. Materiály s vysokou elektrickou vodivostí jsou vhodné k využití jako elektrodotné materiály, to znamená k výrobě vodičů, elektrických spojů, elektrod nebo pro venkovní elektrická vedení. Nejvodivějším materiálem je stříbro (Ag), v praxi se ale běžně využívá spíše měď (Cu) a hliník (Al). Pro dobré elektrodotné vlastnosti jsou používány také ušlechtilé (drahé) kovy. Materiály mající velký elektrický odpor slouží zase jako

odporové materiály pro měřicí přístroje, např. topná tělesa nebo vlákna žárovek. Nejobvyklejšími materiály jsou slitiny některých kovů, obvykle mědi (nikelin, konstantan, ...).

Technicky čistá měď je kov s druhou nejvyšší elektrickou a tepelnou vodivostí. Vlivem příměsí a vzniku slitin mědi dochází ke zhoršení vodivosti a zvýšení tvrdosti a pevnostních charakteristik mědi. Pokles elektrické vodivosti závisí na druhu příměsí. Měď s příměsí křemíku má např. elektrickou vodivost výrazně nižší než s příměsí stříbra (i přestože má stříbro vyšší vodivost než měď, tak vodivost mědi s příměsí stříbra mírně klesá).

Pozlacené elektrody, které jsou využity v rámci této práce, se využívají velmi často, protože zlato (jako ostatní ušlechtilé kovy) má po platině nejvyšší chemickou odolnost. Z tohoto důvodu je vhodné pro prostředí určená k průběhům různých chemických reakcí, jejichž působením by mohlo časem docházet k poškození materiálu. Ryzí zlato (99,99 % Au) je velmi měkké, a proto se zpevňuje tvorbou slitin se stříbrem, mědí, niklem, platinou nebo paládiem.

Významným materiálem je stříbro mající ze všech kovů největší elektrickou a tepelnou vodivost. Ke zlepšení mechanických vlastností stříbra jsou důležité příměsi (měď, zinek, kadmium, cín, platina nebo nikl). Se zlepšujícími se mechanickými vlastnostmi ale přirozeně klesá elektrická a tepelná vodivost (jako u zlata). Ze stříbra se vyrábí nejpoužívanější elektrody v současné medicínské praxi.

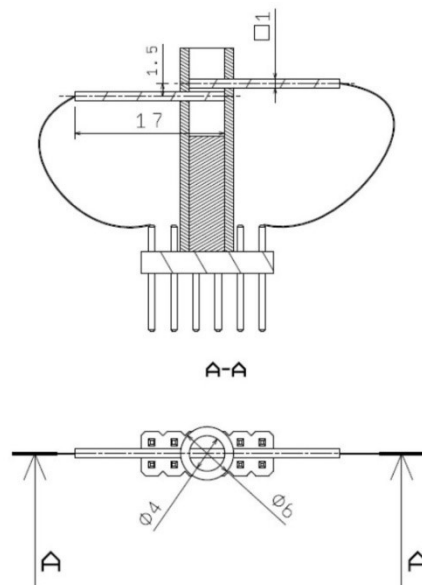
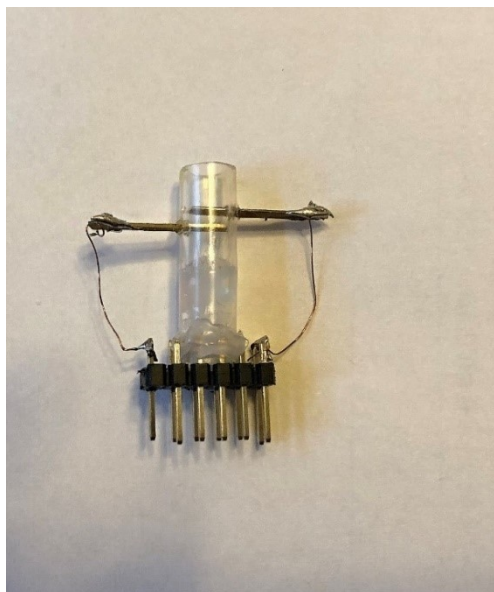
Zajímavým kovem je v tomto směru i platina, která je ze všech kovů chemicky nejodolnější. To znamená, že je odolná proti různým kyselinám a jiným chemikáliím a korozi. Zmíněné vlastnosti jsou příčinou toho, že materiál z platiny je v elektrotechnice používán pro elektrody, kontakty či termoelektrické články. Slitina platiny např. s iridiem zajišťuje navýšení chemické odolnosti a tvrdosti. Obecně, legující prvky platině výrazně korozní odolnost nesnižují. Nevýhodou platiny je její poměrně vysoká cena.

Čtvrtým nejlepším vodičem je hliník udržující si významné postavení v elektrotechnickém průmyslu. Jeho chemická odolnost je velmi vysoká, ale při tvorbě některých slitin dochází k výraznému snížení. Pokud by byl porovnán vodič z hliníku a z mědi se stejnými elektrickými odpory, vodič z hliníku bude o polovinu lehčí. [4]

## 2.5.2 Vybrané elektrody pro ověření funkce systému

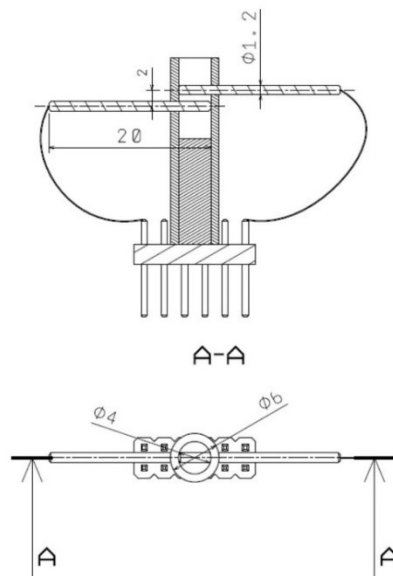
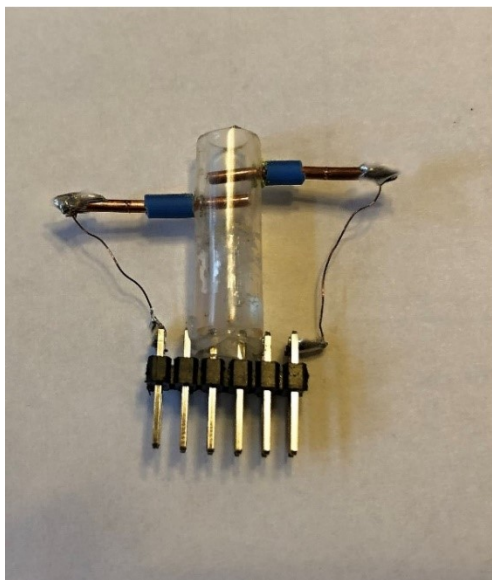
Pro ověření elektrodového systému na různých materiálech byly vybrány v první řadě pozlacené a měděné drátky. Pravděpodobně nejvhodnějším materiálem by byla platina, která ale z důvodu velmi vysoké ceny nemůže být použita. Proto byly jako dalším materiálem k experimentu zvoleny elektrody vytvořené z Ag/AgCl plíšků, které jsou součástí EKG elektrod. U materiálů byly zvoleny podobné rozměry pro lepší porovnávání v rámci vyhodnocování výsledků.

Argentchloridové elektrody byly vytvořeny z končetinových EKG klipsů. Tento materiál je zároveň jedním z nejpoužívanějších materiálů pro konstrukce snímacích elektrod v medicínské diagnostické praxi z důvodu nejmenšího polarizačního potenciálu. Konstrukčně jde o stříbrný drátek, pokrytý vrstvou chloridu stříbrného. Jeho plošný průřez je ve tvaru čtverce, jehož obě strany mají délku 1 mm. Rozměry silikonové hadičky a průměr tenkých měděných drátků, které spojují obě elektrody s vývody pinů, jsou pro všechny materiály elektrod totožné. Také prostor pro aplikaci roztoku je pro všechny elektrody uzpůsoben tak, aby bylo možné do nich aplikovat stejné množství roztoku, a to 0,2 ml.



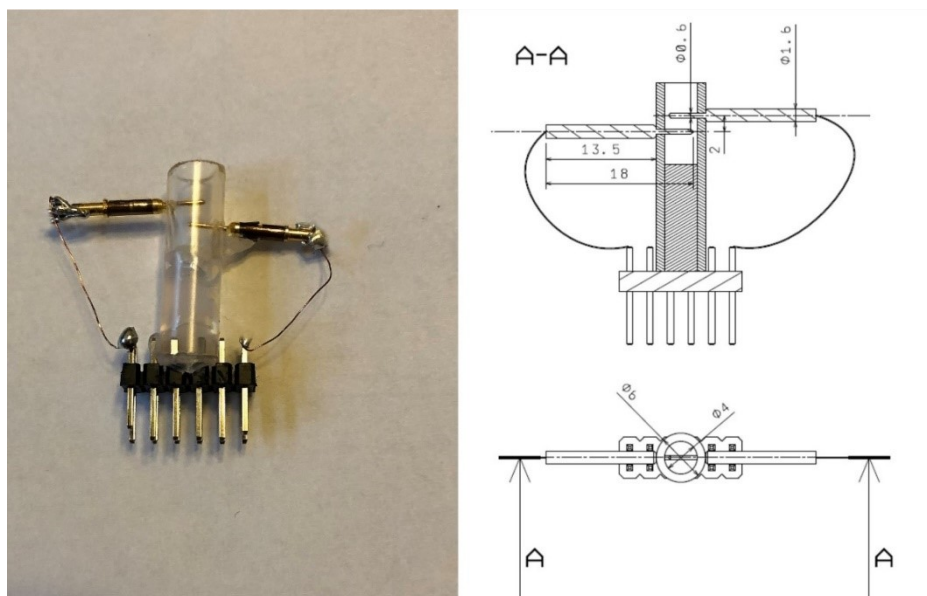
Obr. 16 Ag/AgCl elektrody – konstrukce

Druhé elektrody z mědi dosahují průměru 1,2 mm a vzdálenost mezi nimi je rovna 2 mm. I u této konstrukce elektrodového systému byl stejný postup výroby. To znamená, že na oboustranný kolík o rozměrech  $2 \times 6$  byla upevněna krátká silikonová trubička, vyplněná směsí z tyčinek tavné pistole, a na tuto trubičku byla nasazena ještě jedna delší, taktéž vyplněná stejným materiálem, aby bylo dosaženo dostatečného utěsnění. Otvory v hadičce byly vytvořeny pomocí tenké jehly.



Obr. 17 Měděné elektrody – konstrukce

Třetí pozlacené elektrody mají průměr 0,6 mm, a jsou tak zároveň nejtenčími ze všech tří použitých elektrod. Části elektrod nacházející se mimo měřicí celu mají o 1 mm větší průměr a tato skutečnost zajišťuje menší riziko vytečení měřeného roztoku z měřicí cely přes díry v silikonové hadičce.



*Obr. 18 Pozlacené elektrody – konstrukce*



### 3 Návrh a realizace SW aplikace pro zpracování měřených dat

Jako výchozí program pro návrh a následnou realizaci softwarové aplikace ke zpracování naměřených dat bylo vybráno grafické programovací prostředí LabVIEW (Laboratory Virtual Instruments Engineering Workbench). Toto prostředí s bohatými knihovnami umožňuje vytvářet různé aplikace pro sběr dat, jejich analýzu a prezentaci. Sběr dat do počítače může probíhat přes rozhraní RS 232 nebo GPIB, ze systému na bázi VXI a ze zásuvných multifunkčních karet. Aplikace vyhotovené v prostředí LabVIEW jsou nazývány virtuálními přístroji, protože svým vzhledem a funkcí jsou podobné skutečným měřicím přístrojům, jako je například multimetr nebo osciloskop.

Uživatelské rozhraní aplikace je vytvářeno prostřednictvím ovládacích a indikačních objektů v čelním panelu (Front Panel), který je vytvářen zpravidla na začátku grafického programování aplikace. Indikační prvky (Indicators) mají zobrazovací charakter a mezi ně patří zejména grafy pro zobrazování průběhových křivek a LED diody. Ovládacími prvky (Controls) lze pak upravit parametry zobrazení výstupů signálů, například změnit amplitudu signálu v grafu apod. Tyto prvky existují v podobě tlačítek, stupnic nebo otočných knoflíků a jsou umístěny společně s indikátory na paletě s názvem „Controls“.

Po dokončení čelního panelu je potřeba následně v okně blokového diagramu vytvořit programový kód propojením jednotlivých ovládacích prvků a indikátorů vodiči a nastavením jejich parametrů. Blokový diagram představuje vlastně zdrojový kód v přehledné grafické podobě, kde jsou obsaženy všechny prvky a indikátory ve formě terminálů. Čelní panel je takto vytvořeným programovým kódem v blokovém diagramu řízen.

Do kódu se vkládají i tzv. expresní VI nacházející se na paletě „Function“ a zobrazované v blokovém diagramu jako modré obdélníky s identifikátorem a různými vstupy a výstupy podle charakteru funkce. Po dokončení celého programu lze vytvořit aplikaci ve formátu EXE a využívat ji nezávisle na vývojovém prostředí. [24]

V následujících podkapitolách jsou podrobněji popsány vytvořené aplikace pro měření z elektrodového měřicího systému, seřazené sestupně podle náročnosti jejich tvorby.



Obr. 19 Úvodní obrazovka prostředí LabVIEW

### 3.1 Čelní panel – mikrofonní vstup

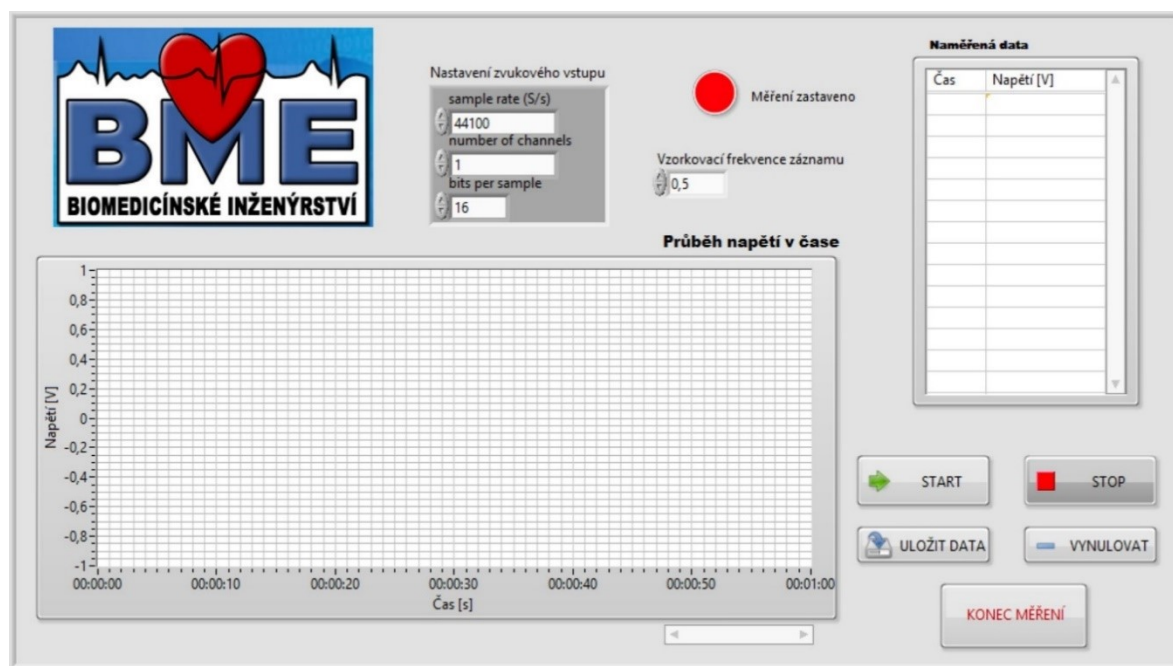
Uživatelské rozhraní vytvořené v čelním panelu pro měření představuje ovládací a zobrazovací část virtuálního přístroje, který umožňuje zaznamenávání dat pomocí mikrofonního vstupu počítače a na němž jsou během měření zachycena veškerá data z příslušného měřicího obvodu.

V rámci této diplomové práce byl vytvořen uživatelský panel, který poskytuje všechny informace a funkce potřebné ke správnému posouzení chemických reakcí při měření roztoků glukózy.

Dominantou uživatelského rozhraní je graf zobrazující závislost elektrického napětí na čase, který je určen k zobrazování aktuálního napětí v měřicím obvodu. Graf je tvořen dvěma osami, osou Y odkazující na aktuální napětí a osou X přiřazující k příslušné hodnotě napětí odpovídající časový údaj v měřicím intervalu.

Při spuštění aplikace je možné aktivovat měření tlačítkem START, kdy začne vyhodnocování a zobrazování měřeného napětí a jeho zápis do tabulky umístěné vedle grafu. Tento proces lze kdykoliv zastavit tlačítkem STOP.

Ve fázi zastavení je možné zhlédnout naměřené hodnoty napětí v přehledné tabulce a uložit je (tlačítkem ULOŽIT DATA) na námi definované místo v počítači s přesně určeným názvem souboru ve formátu XLS. Je vhodné si zvolit vždy takový název souboru, aby bylo možné ho jednoznačně identifikovat. Jako formát určený pro uložení naměřených hodnot byl vybrán EXCEL z důvodu snadného zpracování naměřených výsledků ve formě grafů a nejrůznějších statistických analýz. Po uložení lze naměřená data v grafu i v tabulce čelního panelu smazat (tlačítkem VYNULOVAT) a s opětovným stiskem tlačítka START provádět další měření. Tento proces je možné provádět, kolikrát je potřeba. Stav, kdy probíhá a neprobíhá měření, jsou vizuálně indikovány barevnou kontrolkou s příslušným textem vedle ní. Při načítání dat do grafu a tabulky je zobrazen text „Probíhá měření“ a kontrolka svítí zeleně. V případě přerušeného měření se objeví text „Měření zastaveno“ a kontrolka je zbarvena dočervena. Pro definitivní ukončení měřicí aplikace slouží tlačítko KONEC MĚŘENÍ, po jejímž stisknutí se měřicí aplikace vypne.



Obr. 20 LabVIEW čelní panel – mikrofonní vstup

## 3.2 Blokový diagram – mikrofonní vstup

Pokud je v nabídkové liště čelního panelu rozkliknuta možnost „Show Block Diagram“, zobrazí se blokový diagram, který vizuálně znázorňuje tok dat generovaných elektrodovým systémem a jejich zpracování pomocí jednotlivých bloků tak, aby byl signál správně zobrazen v grafu čelního panelu a aby ostatní zakomponovaná funkční tlačítka virtuálního přístroje plnila předem stanovený účel.

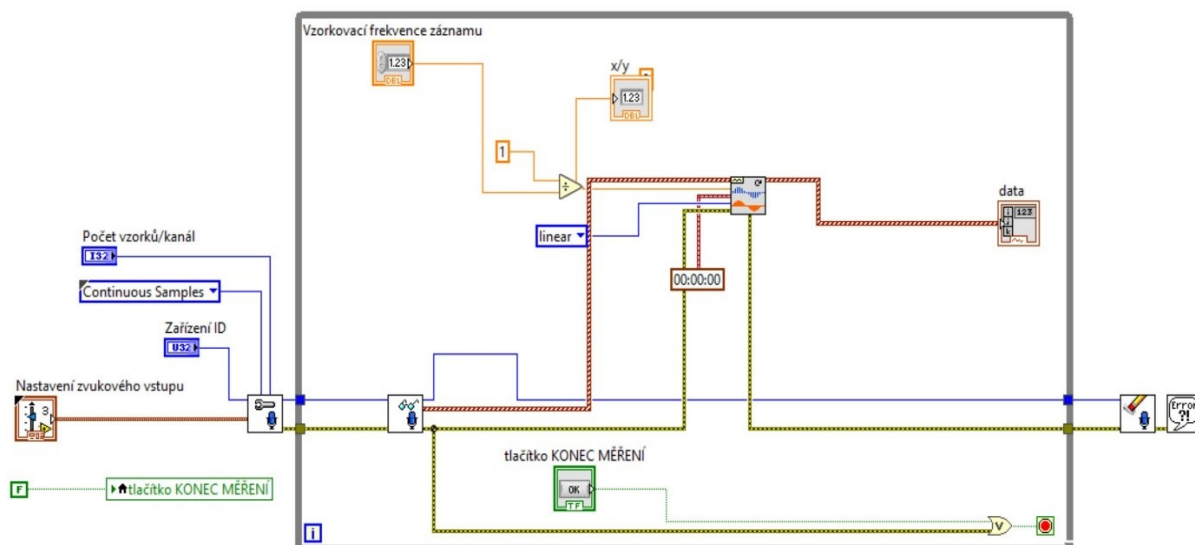
Vytvořený blokový diagram je rozdělen do čtyř klíčových funkčních částí, ohraničených tzv. strukturami, které graficky nahrazují v klasických programovacích jazycích cykly, podmíněné příkazy apod. V tomto blokovém diagramu jde konkrétně o while struktury, zajišťující opakování daného dílčího subdiagramu, dokud nenastane nějaký konkrétní stav, a provádí se alespoň jednou. Jednotlivé bloky jsou propojené ve smyslu signálového toku čarami, jejichž barva a tvar identifikuje typ proměnné, která je jimi přenášena.

Před vstupem snímaného signálu do první while smyčky je potřeba nakonfigurovat zařízení pro získávání dat a jejich odesílání do vyrovnávací paměti. Zde je použit blok pro nastavení zvukového vstupu, protože snímaný signál z elektrodového měřicího systému je veden do mikrofonního vstupu. Toto nastavení je možné měnit na čelním panelu přístroje a jde o hodnoty počtu kanálů, bitů na vzorek (standardně 16 bitů) a vzorkovací frekvenci. Do bloku určeného ke konfiguraci vede mimo již zmíněného ještě několik parametrů, které je nutné nadefinovat. Je potřeba uvést počet vzorků na kanál. Při nastavení vysoké hodnoty této veličiny dochází k nepřetržitému ukládání do paměti. Pokud chceme využít méně paměti, zadáváme hodnotu menší. Dalším parametrem je vzorkovací režim. Ten má dvě možné varianty, které určují celkové chování virtuálního přístroje. V případě, že nastavíme tento blok na „Finite Samples“, přístroj získá vzorky jen tolikrát, kolikrát je zadáno v bloku s počty vzorků na kanál. Aby se vzorky načítaly kontinuálně, nastavíme blok na „Continuous Samples“. Číslo ID jen identifikuje zařízení, ze kterého se získávají aktuálně měřená data. Jako doporučené výchozí ID se udává hodnota 0. Pokud je používáno více zařízení, tak se číslo ID pohybuje od 0 do  $n - 1$ , kde  $n$  je počet zařízení, ze kterých se získávají data. Pro tento konkrétní virtuální přístroj je nastaveno ID zařízení na hodnotu 0, protože signál ke zpracování přichází pouze z jednoho zdroje, a tudíž není nutné definovat více senzorů. Vzorkovací mód je nadefinován na kontinuální odběr vzorků, protože je potřeba ze vstupu načítat nekonečně mnoho hodnot.

Signálový tok vstupuje z konfigurace do první smyčky a ústí do bloku sloužícího ke čtení dat ze vstupního zvukového zařízení. Booleanovská funkce OR je do schématu zakomponována tak, že pokud dojde v rámci načítání vstupních dat k chybě nebo pokud je stisknuté tlačítko STOP, celá smyčka se ukončí (zastaví se získávání dat). Člen OR provádí tzv. logický součet (disjunkci), což znamená, že jsou-li na vstupu obě dvě hodnoty FALSE, výsledek je také FALSE. V ostatních případech tento logický člen podle pravdivostní tabulky vrátí hodnotu TRUE. Za situace výskytu chyby je vymazána vyrovnávací paměť a úloha se vrací do výchozího stavu.

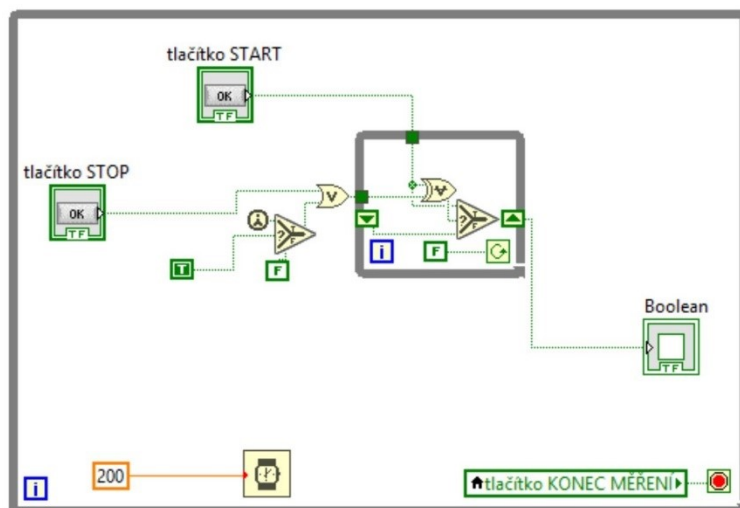
Při správné funkci programu jsou všechna data čtena z interní vyrovnávací paměti a vedena do korekčního bloku „Resample Waveforms“, který upravuje signál podle přednastavených vstupních parametrů. Do vstupu „dt“ přichází hodnota periody vypočítaná pomocí předem zvolené vzorkovací frekvence na čelním panelu a pomocí hodnoty „1“ ve členu pro dělení vstupů. Vstupem „t0“ je nastaven počáteční čas signálu a poslední parametr, režim interpolace, určuje algoritmus převzorkování vstupujícího signálu. Data jsou pak zapsána do lokální proměnné „data“, se kterou je možné v rámci celého blokového diagramu dále pracovat.





Obr. 21 LabVIEW blokový diagram 1 – mikrofonní vstup

Druhá while struktura upravuje pouze koordinaci funkcí tlačítek čelního panelu, a tak zde vůbec nedochází k virtuálnímu přenosu naměřených dat mezi bloky, ale k přenosu čistě booleanovských hodnot, jejichž koncovou hodnotou je taktéž booleanovská hodnota, uložená do lokální proměnné, která určuje mimo jiné barvu LED diody na čelním panelu virtuálního přístroje a se kterou se pracuje, stejně jako s lokální proměnnou „data“ z předešlé struktury, v největší třetí smyčce. Jinými slovy výstupní hodnota druhé struktury identifikuje to, zda dochází aktuálně k měření, nebo ne. Blok hodin v každé následující smyčce se vstupující hodnotou představuje dobu opakování v milisekundách, po které vždy dojde k opětovnému provedení smyčky, protože není nutné, aby se smyčka prováděla tak často.



Obr. 22 LabVIEW blokový diagram 2 – mikrofonní vstup

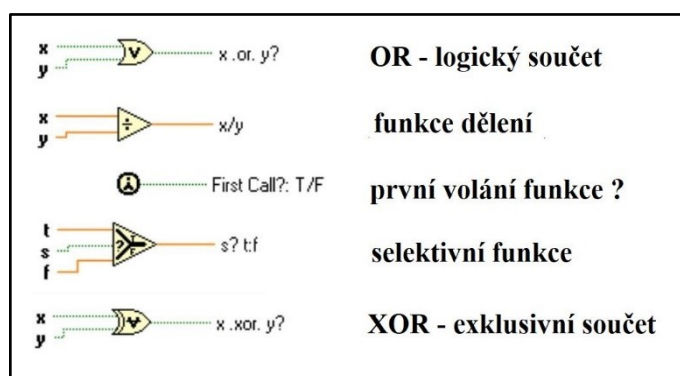
Více k jednotlivým členům ve smyčce: Ve druhé struktuře se nachází několik booleanovských konstant, dva logické členy, dvě selektivní funkce a jedna vnitřní smyčka.

Mimo logického členu OR, který již byl vysvětlen, je do schématu zakomponován ještě člen XOR, tzv. exkluzivní součet. Ten bude udávat na výstupu hodnotu FALSE za situace, že vstupní

hodnoty jsou totožné (tj.  $2 \times$  hodnota FALSE nebo  $2 \times$  hodnota TRUE), v opačném případě bude na výstupu hodnota TRUE.

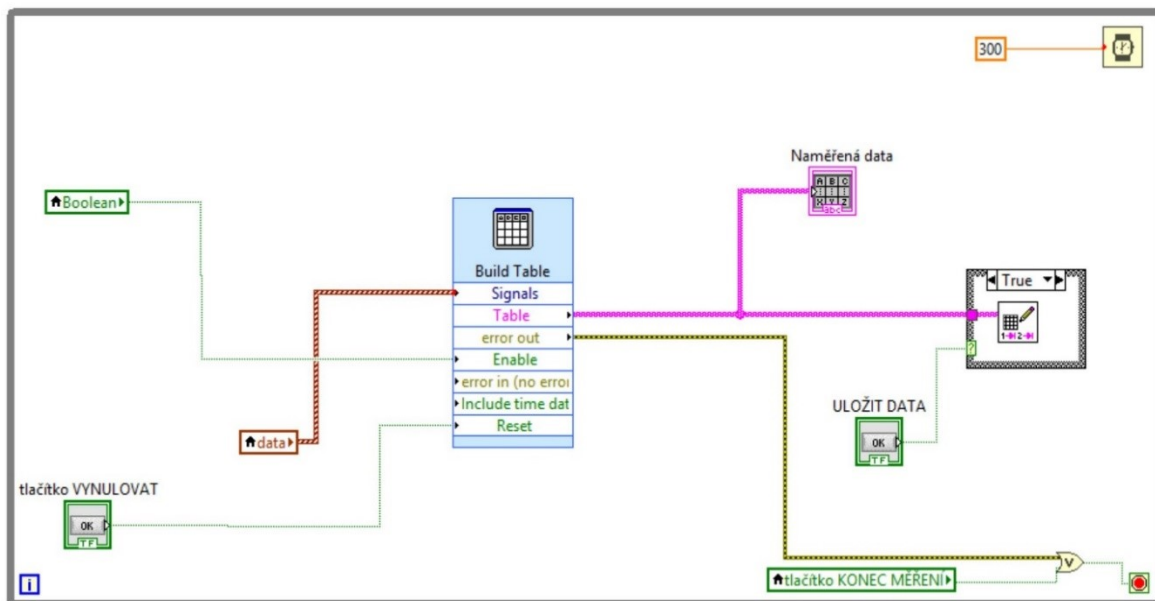
Selektivní funkce vrací hodnotu připojenou ke vstupu „t“ nebo „f“ v závislosti na hodnotě „s“. Pokud hodnota „s“ nabývá hodnoty TRUE, funkce vrátí hodnotu na vstupu „t“. V opačném případě bude výsledek rovný hodnotě na vstupu „f“.

Na selektivní funkci je navázána funkce nazývaná „First Call“, nabývající hodnoty TRUE při prvním spuštění části blokového diagramu. Takové spojení zapříčiňuje to, že pokud již není blokový diagram spuštěn poprvé (ze selektivní funkce vychází logická hodnota FALSE) a zároveň není stisknuté tlačítko STOP, na výstupu logického členu OR je hodnota FALSE. Do menší smyčky ještě vstupuje logická hodnota indikující, zda je stisknuté tlačítko START. Smyčka má samozřejmě i pojistku pro zastavení celé struktury, která je aktivována stiskem tlačítka KONEC MĚŘENÍ, definovaným v této smyčce lokální proměnnou.



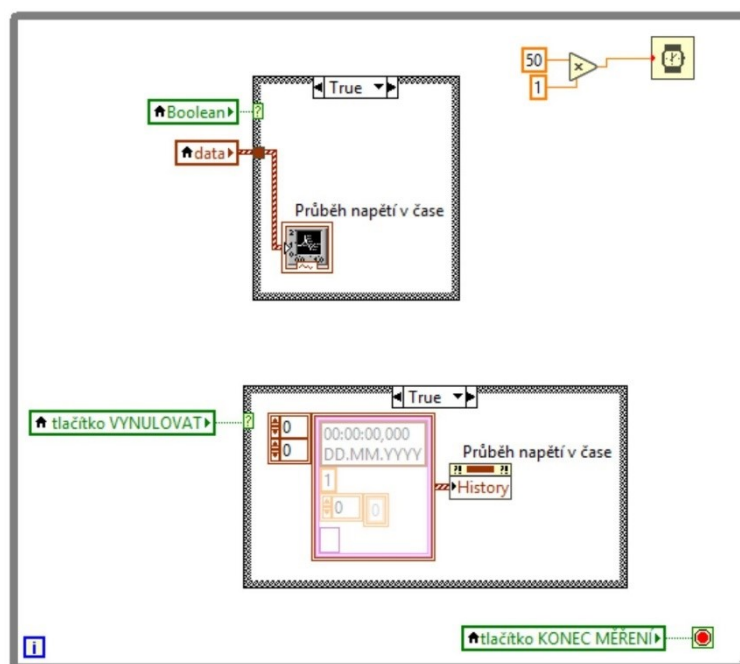
Obr. 23 LabVIEW – funkce

Uvnitř třetí struktury jsou již použity obě lokální proměnné z předchozích smyček. Lokální proměnné „boolean“ a „data“ vstupují do bloku expresní funkce „Build Table“, která převádí signál do tabulky dat a každému bodu signálu přiřadí časový údaj. Výstup „Table“ vede do bloku odkazujícího na tabulku v čelním panelu virtuálního přístroje a zároveň do case struktury. Pomocí ní lze vykonávat více možných operací v závislosti na hodnotě, která přichází na case selektor. Tato hodnota může být jakéhokoliv datového typu. V tomto případě se jedná o datový typ boolean. To znamená, že pokud je stisknuto tlačítko ULOŽIT DATA, jsou naměřené hodnoty ve formátu tabulky vloženy s příslušným časovým údajem do vybrané složky v počítači. Chyba činnosti ve funkci „Build Table“ je vyřešena tím, že její „error out“ výstup je veden společně s lokální proměnnou tlačítka KONEC MĚŘENÍ do logického členu OR a k ukončení smyčky. Když tedy nastane chyba nebo dojde ke stisku příslušného tlačítka, ukončí se vykonávání příkazů v tomto diagramu a skončí načítání dat jak do grafu, tak i tabulky.



Obr. 24 LabVIEW blokový diagram 3 – mikrofonní vstup

Ve čtvrté struktuře se nachází další dvě case smyčky, z nichž jedna zajišťuje načítání hodnot do grafu umístěného na čelním panelu virtuálního přístroje. Na case selektor je tentokrát vedena lokální booleanovská proměnná nadefinovaná ve druhé struktuře blokového diagramu. V případě, že se do lokální proměnné „boolean“ запиše hodnota TRUE (tzn. dochází k načítání hodnot z elektrodového měření), dojde k provedení subdiagramu navázaného na tuto logickou hodnotu a naměřený signál se začne zapisovat do grafu. Za opačného stavu se subdiagram nevykoná a hodnoty se do grafu zapisovat nebudou. Stejně pracuje i druhá struktura, na jejíž provedení je zase navázáno tlačítko VYNULOVAT, a v případě přicházející hodnoty TRUE smaže naměřené výsledky z grafu i tabulky v čelního panelu.

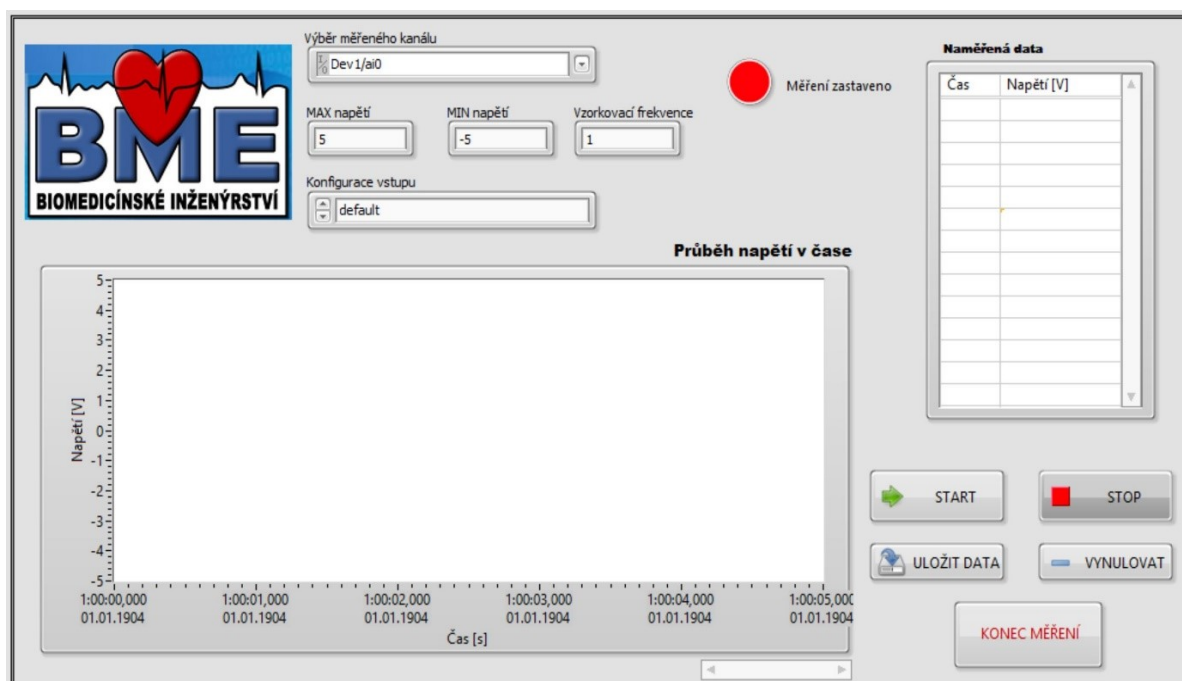


Obr. 25 LabVIEW blokový diagram 4 – mikrofonní vstup

### 3.3 Čelní panel – měřicí karta

Čelní panel virtuálního přístroje, vytvořený k vizualizaci a záznamu dat elektrodového systému s měřicí kartou, je podstatně intuitivnější a jednodušší. Vlastně jediný totožný parametr nastavovaný i u čelního panelu k mikrofonnímu vstupu je zvolení vzorkovací frekvence. Ta je nastavena v tomto případě na 1 Hz, aby docházelo k záznamu hodnot napětí každou 1 sekundu. Nové numerické indikátory zobrazují nastavení nejvyšší a nejnižší hodnoty napětí, kterou by měřený signál měl mít. Po načtení měřicí karty lze ve výběru měřeného kanálu zvolit, z jakého nebo jakých kanálů bude probíhat snímání. Konfigurace vstupu je standardně nastavena na výchozí, ostatní možnosti se využívají pro specifické druhy měřicích úloh.

Ostatní články čelního panelu mají stejnou funkci jako v předchozím případě. Tlačítka mají stejnou funkci a data se při měření načítají zároveň do grafu i do tabulky s možností uložení a vymazání. Barevný logický LED indikátor informuje o stavu měření („Probíhá“ nebo „Neprobíhá“).



Obr. 26 LabVIEW čelní panel – měřicí karta

### 3.4 Blokový diagram – měřicí karta

Blokový diagram se liší převážně na začátku programového kódu z důvodu nutného rozdílného nastavení konfigurace vstupu. Je to proto, že se zde nevyužívá vstup zvukový, ale USB port propojený s elektrodovým měřicím systémem přes měřicí kartu.

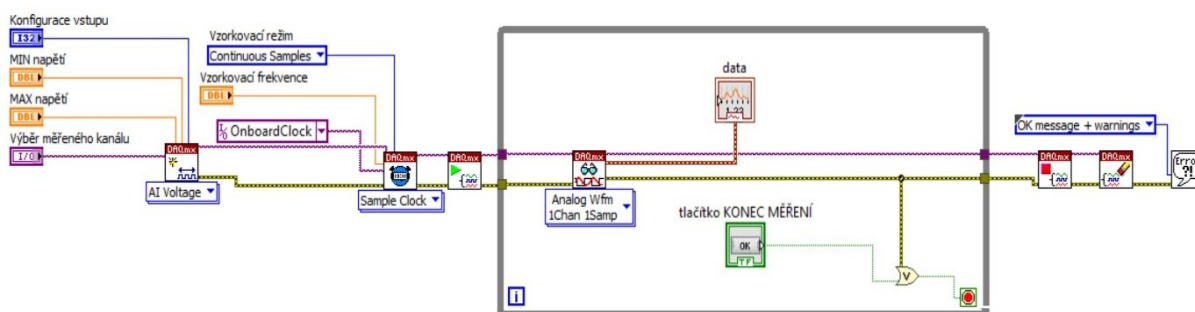
V úvodu se tedy nachází blok pro tvorbu virtuálního kanálu s parametrickými vstupy, které odkazují na nastavitelné ikonky v čelním panelu virtuálního přístroje. Jde o nastavení maximální a minimální povolené hodnoty napětí, výběr měřeného kanálu a konfiguraci vstupu. Přímou do bloku pro tvorbu kanálu se zadává, z jakého konektoru měřicí karty bude probíhat komunikace, a tedy do jakého vstupu bude zapojen elektrodový měřicí systém (analogový/digitální, vstup/výstup). V tomto případě je nastaven jako virtuální kanál analogový vstup a zároveň je vybrána i veličina, která bude měřena, tj.

napětí. Z bloku vystupuje cesta představující vytvořený virtuální kanál a cesta pro hlášení chyby, zapříčiňující neprovedení následujícího bloku, do něhož cesta s chybou vstupuje. Ta může nastat, není-li například měřicí karta připojena k počítači.

Úkolem dalšího bloku je časování, probíhající pomocí proměnných, které do něj vstupují. Zde lze nastavit rychlost vzorkovacích hodin prostřednictvím vzorkovací frekvence nastavující se v čelním panelu a počet vzorků, které budou vygenerovány. Pro tuto aplikaci je vhodné nastavit vzorkovací režim na kontinuální nepřetržité načítání vzorků až do spuštění bloku ukončujícího úlohu měření dat. Zdroj hodin zůstává ve výchozím nastavení.

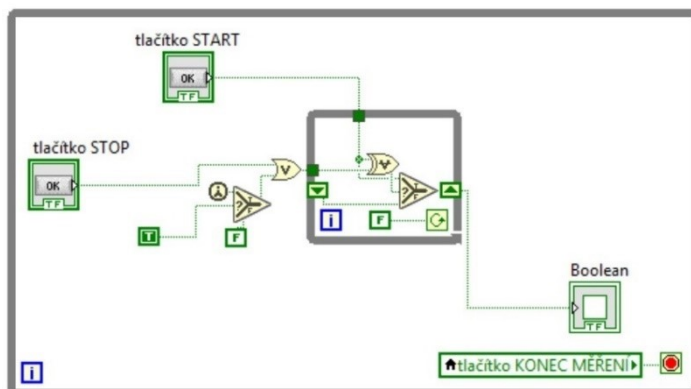
Dále se v blokovém kódu nachází dvě spolu související funkce, přičemž jedna z nich odstartovává měřicí úlohu a druhá ji ukončuje. Blok ukončovací je ještě napojen na blok určený ke smazání příslušné úlohy. Ten kompletně zruší existenci celé měřicí úlohy, nadefinované v bloku pro tvorbu virtuálního kanálu. Samozřejmostí je zavedení indikátoru chyby do diagramu.

Bloky jsou cestami propojeny s while smyčkou, ve které se nachází funkce zajišťující čtení dat z vykonávané úlohy. V této části se nastavuje druh signálu a počet kanálů používaných k měření. Pro potřebu této aplikace je nastaven analogový signál a jeden kanál. Z výstupu čtecí funkce vychází data ve formě jednorozměrného pole hodnot odpovídajícího hodnotám z virtuálního kanálu a ukládají se do lokální proměnné „data“. Jako v předchozím blokovém diagramu je pomocí logické funkce OR, která je navázaná na tlačítko KONEC MĚŘENÍ a cestu chybových hlášení, zajištěno ukončení úlohy smyčky.



Obr. 27 LabVIEW blokový diagram 1 – měřicí karta

Druhá booleanovská struktura je téměř totožná s druhou strukturou blokového diagramu pro měření prostřednictvím mikrofonního vstupu. Chybí zde pouze blok hodin. Ke snadnějšímu pochopení principu druhé smyčky může sloužit tabulka 4, která udává v závislosti na koordinaci tlačítek START a STOP výsledné logické hodnoty vystupující ze smyčky a ukládající se do lokální proměnné.

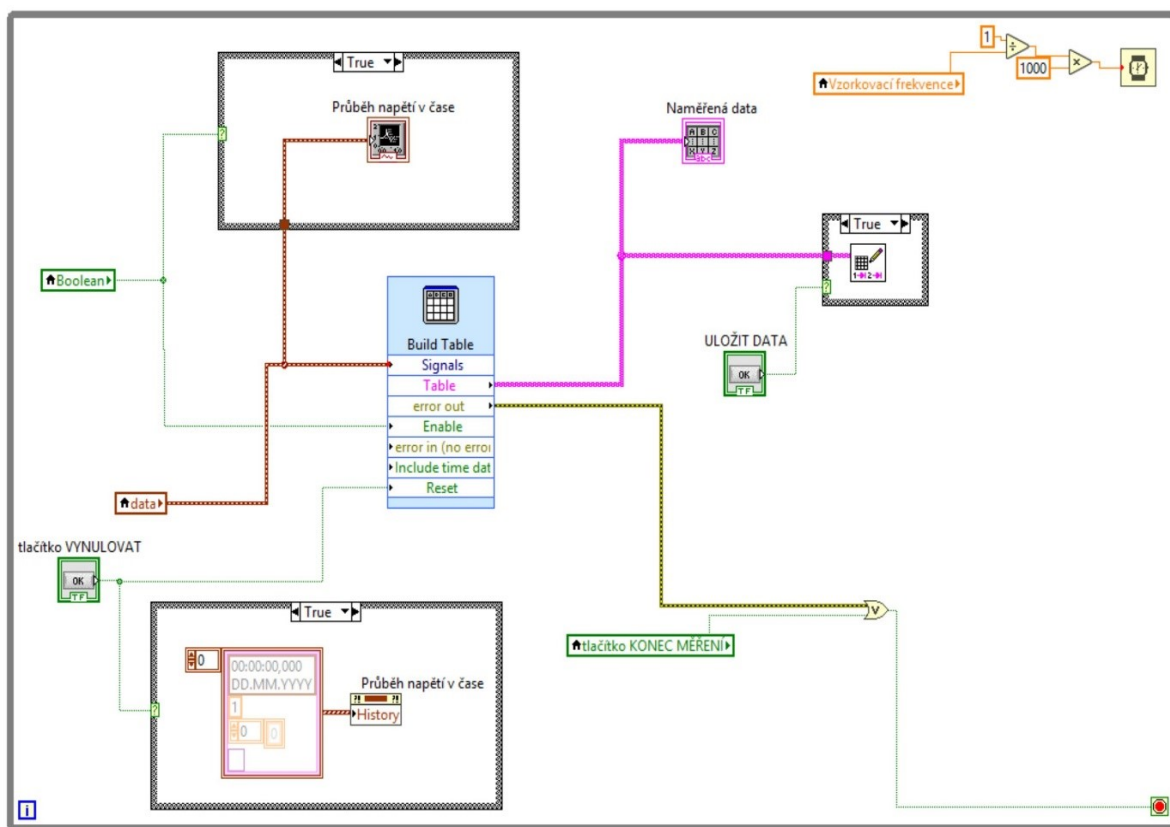


Obr. 28 LabVIEW blokový diagram 2 – měřicí karta

Tab. 2 Pravdivostní tabulka

tlačítko START	tlačítko STOP	Výsledná logická hodnota
0	0	0
0	1	0
1	0	1
1	1	-

Třetí struktura funguje také na stejném principu jako v předchozím řešení. Data a logická hodnota z lokálních proměnných jsou vedeny cestami do bloku expresní funkce „Build Table“, která převádí signál do tabulky dat s časovým údajem. Pokud je v lokální proměnné hodnota TRUE, je zároveň proveden zápis dat do grafu v čelním panelu. Funkce tlačítka VYNULOVAT je zajištěna stejným způsobem jako v předchozím řešení. Upravená data z expresní funkce vedou cestou do terminálu grafu, odkazujícího na graf v čelním panelu přístroje, a do case smyčky, která zajišťuje při stisku tlačítka ULOŽIT DATA zápis tabulky do souboru XLS. Ukončení třetí smyčky je založeno na stejném principu jako v předchozí smyčce.



Obr. 29 LabVIEW blokový diagram 3 – měřicí karta



## 4 Ověření funkčnosti navržené elektrody s různými materiály

S pomocí vytvořeného softwaru v prostředí LabVIEW a měřicí karty byly v rámci experimentálního měření zjišťovány hodnoty napětí z měřicího systému se třemi druhy výše popsaných elektrod. Software byl nastaven tak, aby hodnoty napětí zaznamenával každou 1 sekundu po celkové dobu 150 s, tj. dvě minuty a půl. Každý materiál byl ověřen na měřicím systému pro čtyři různé koncentrace glukózy a každá jednotlivá koncentrace byla otestována desetkrát bez enzymu a desetkrát s enzymem glukózooxidázou. Měření s enzymem probíhalo o něco déle, celkově 220 s, z důvodu pomalé změny napětí po značném nárůstu během chemické reakce. Enzym ve formě prášku od firmy VWR, který byl aplikován do roztoku po prvních 20 sekundách probíhajícího měření v množství 0,01 g, je získáván z houby *Aspergillus niger* (Kropidlák černý).

Z důvodu velké sady naměřených hodnot napětí během experimentu jsou kompletní tabulky umístěny pouze na CD u této diplomové práce.

Jednotlivé koncentrace glukózy byly vybrány tak, aby pokrývaly rozsáhlejší možnosti naměřeného napětí a aby bylo možné lépe odlišit hodnoty napětí příslušných koncentrací. Množství glukózy rozpuštěné ve zkoumaném vzorku je definováno jeho molární koncentrací. Hodnota molární koncentrace roztoku je přímo úměrná látkovému množství v jednotkách mol a nepřímo úměrná objemu roztoku v litrech. Na základě faktu, že 1 mmol glukózy je 0,18 g, lze snadno vypočítat množství glukózy, které je potřeba smíchat s destilovanou vodou, aby vznikl požadovaný roztok o předem zvolené koncentraci. Destilovaná voda je vybrána z důvodu obsahu velmi malého množství minerálních látek a volných iontů. Pro účely experimentu byla vybrána běžně používaná a lehce dostupná technická destilovaná voda, jejíž měrná elektrická vodivost je rovna  $0,0015 \text{ S} \cdot \text{m}^{-1}$ . Veličina měrné elektrické vodivosti závisí na koncentraci iontů nejrůznějších rozpuštěných látek v roztoku a je funkcí teploty roztoku a aktivity rozpuštěných látek. To znamená, že pokud teplota roztoku stoupne, tak vodivost, která úzce souvisí s pohyblivostí iontů, také vzroste. Jestliže jsou ionty menší, jsou pohyblivější a přispívají více k elektrické vodivosti roztoku. Mezi takovéto ionty patří např.  $\text{H}_2\text{O}^+$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{K}^+$  nebo  $\text{Cl}^-$ .

Při aplikaci samotné destilované vody do elektrodového systému by teoretická hodnota měla být zanedbatelná, v reálu je alespoň minimální, v tomto případě bylo naměřeno napětí pohybující se kolem hodnoty 0,00116 V. Měření čisté destilované vody probíhalo před každým následujícím měřením, protože nízká hodnota napětí indikovala dostatečné vymytí měřicího prostoru. [6]

Pro experimentální měření byly zvoleny čtyři různé koncentrace glukózy, a to 6 mmol/l, 12 mmol/l, 20 mmol/l a 25 mmol/l. V tabulce 4 jsou přehledně sepsány jednotlivé koncentrace s množstvím přidávané glukózy. V následujících podkapitolách jsou popsána měření se třemi koncentracemi roztoků, čtvrtý (25 mmol/l) je uveden v příloze na CD, kde je i fotodokumentace z experimentálního měření.

Tab. 3 Koncentrace glukózy

	Molární koncentrace [mmol/l]	Množství glukózy [g/l]
1	6 mM	1,08
2	12 mM	2,16
3	20 mM	3,60
4	25 mM	4,50

Jelikož byla glukóza použita ve formě svého 40% roztoku, bylo nutné dopočítat správně objem destilované vody a glukózy. Po zvolení výsledného objemu a za předpokladu, že je známa koncentrace obou roztoků, lze snadno dopočítat objemy obou tekutin podle soustavy dvou rovnic

$$V = V_1 + V_2 \quad (4.1)$$

$$c = \frac{(c_1 V_1 + c_2 V_2)}{V} \quad (4.2),$$

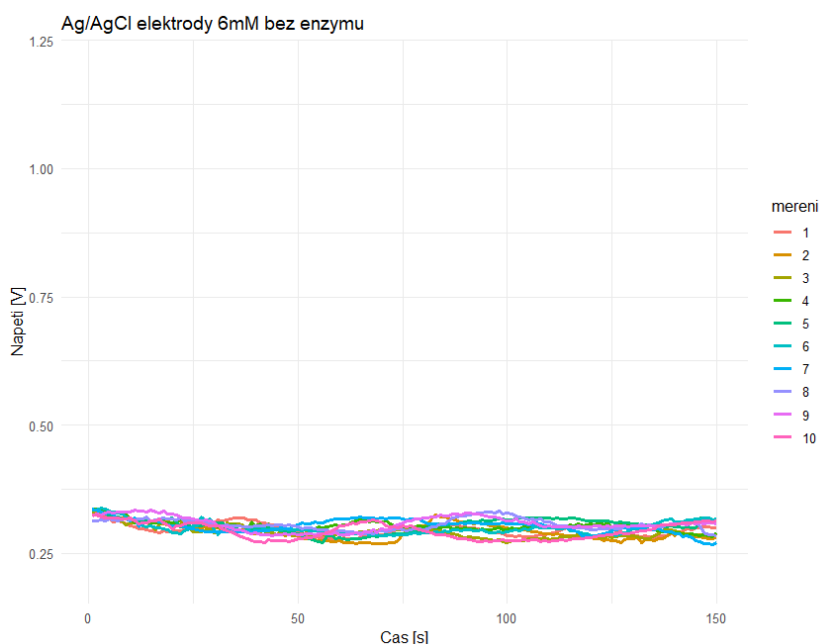
kde  $V$  je objem výsledného roztoku,  $V_1$  a  $V_2$  objemy původních roztoků,  $c$  je koncentrace výsledného roztoku a  $c_1$  a  $c_2$  koncentrace původních roztoků.

Před každým následujícím měřením bylo potřeba elektrodu pečlivě vymýt destilovanou vodou a vysušit, aby nebylo následující měření ovlivněno.

Během měření byl do poloviny měřených vzorků aplikován enzym glukózooxidáza ve formě suchého prášku, který bylo nutné skladovat v mrazničce.

## 4.1 Ag/AgCl elektrody

Jako první byly otestovány argenchloridové elektrody, které jsou hojně využívány v lékařské praxi. V grafu 1 je zaznamenán průběh napětí všech deseti pokusů v čase prvních 150 sekund se vzorky o koncentraci 6 mmol/l. Z grafu je viditelné, že počáteční hodnoty napětí se liší opravdu minimálně, nicméně poté se nelineárně zvyšují a snižují. To může být v první řadě přisuzováno proměnné teplotě roztoku nebo pohybu elektrod. Pokud je ale na průběh grafu pohlíženo z širší perspektivy, je evidentní, že ačkoliv se napětí během snímání různě mění, tak všechny křivky mají pomalý sestupný charakter.

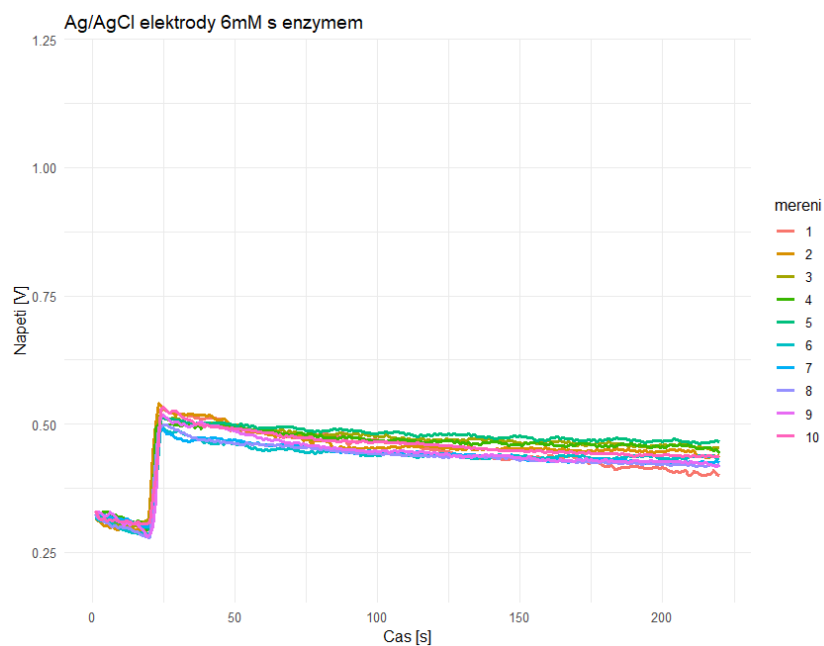


Graf 1 Ag/AgCl elektrody 6mM bez enzymu

V grafu 2 je vyobrazena závislost napětí na čase s koncentrací roztoků 6 mmol/l a s použitím enzymu. Po aplikaci enzymu do roztoku je znatelné prudké a rychlé navýšení hodnoty napětí a pak její velmi pomalé klesání. Nejvyšší hodnota napětí po její rychlé změně je přisuzována saturaci roztoku. To znamená, že roztok v tomto okamžiku nemůže již rozpustit další látky. Z grafu je také patrné, že po

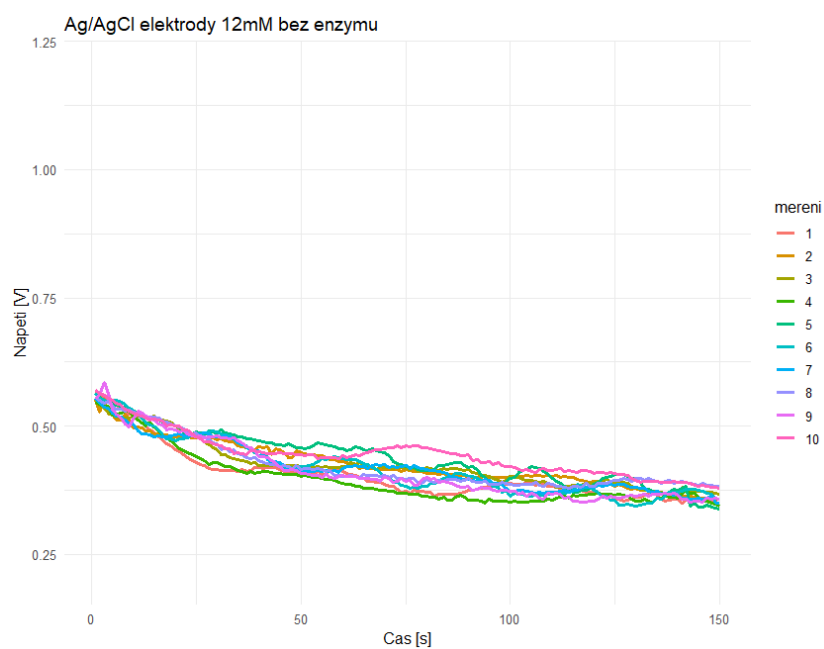


aplikaci roztoku jsou výkyvy v hodnotách napětí během měření daleko menší než v hodnotách napětí měřených bez enzymu.



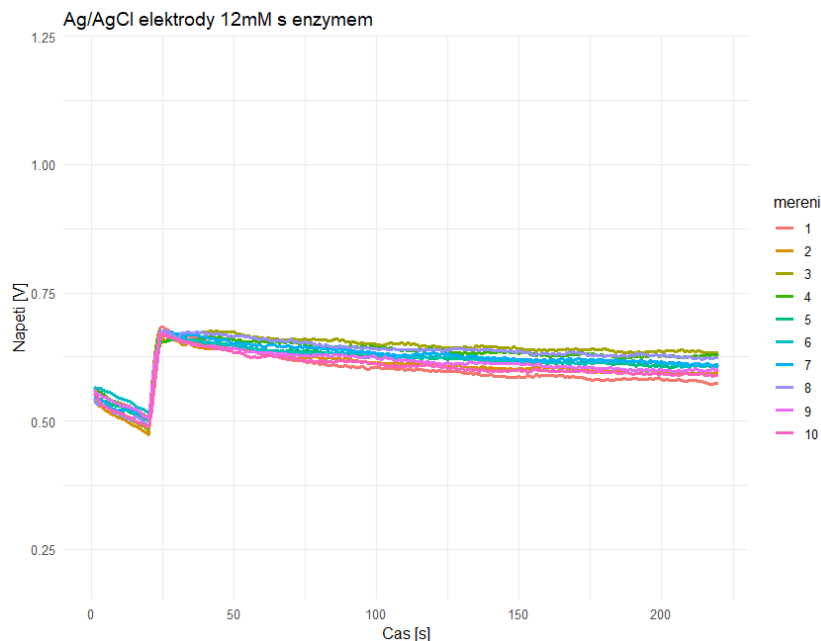
*Graf 2 Ag/AgCl elektrody 6mM s enzymem*

Graf 3 znázorňuje průběhy napětí roztoků o koncentraci glukózy 12 mmol/l bez použití enzymu. Křivky jsou opět velmi podobné na začátku měření a v jeho průběhu se různě mění. Nicméně v širším měřítku mají opět postupně klesající tendenci. Hodnoty jsou vyšší než u roztoku s nižší koncentrací, což bylo jedním z předpokladů.



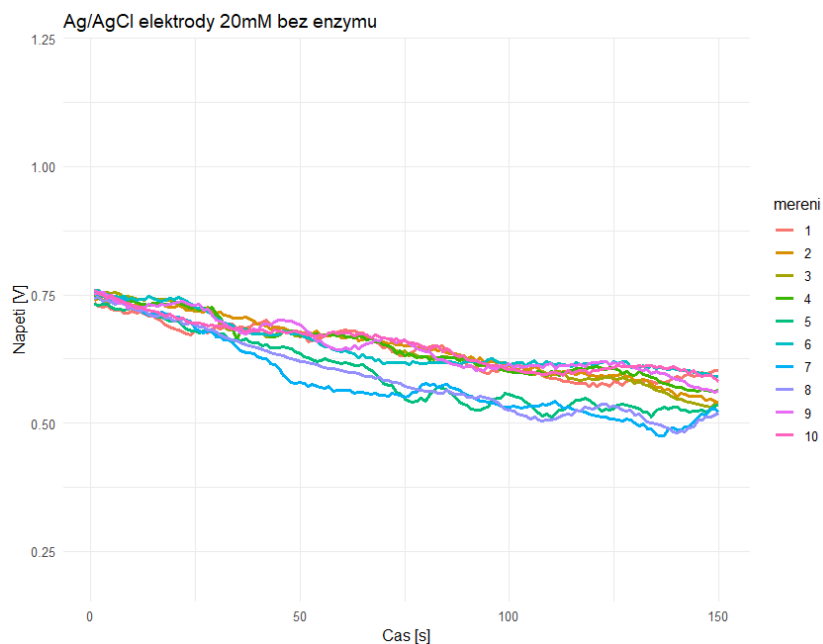
*Graf 3 Ag/AgCl elektrody 12mM bez enzymu*

Do grafu 4 jsou zaneseny průběhy, které byly naměřeny během prvních 220 sekund měření s enzymem a roztokem o koncentraci 12 mmol/l. Po 20 sekundách byl opět aplikován enzym. Tato skutečnost je jasně zřetelná nárůstem hodnoty napětí a jeho stabilizací. Napětí po rychlém vzestupu začíná pomalu klesat a v druhé polovině průběhu se zdá být dokonce konstantní.



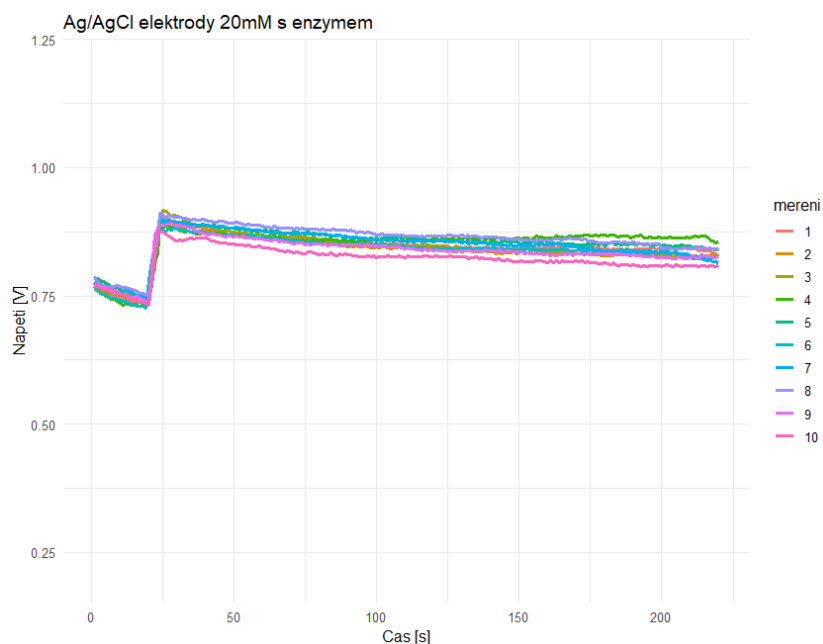
*Graf 4 Ag/AgCl elektrody 12mM s enzymem*

Graf 5 odkazuje na měření s roztokem s druhou nejvyšší měřenou koncentrací glukózy, tj. 20 mmol/l. V porovnání s průběhy roztoků nižších koncentrací je evidentní, že s rostoucí koncentrací glukózy v roztoku se naměřené napětí zvyšuje, což bylo předpokládáno. Hodnoty napětí se opět během měřicího cyklu lehce mění a zároveň postupně klesají, oproti hodnotám z nižších koncentrací dokonce znatelně. Výkyvy v průbězích všeobecně by mohly být zapříčiněny konstrukcí argentchloridových elektrod, na jejichž površích se nacházejí nerovnosti v důsledku jejich výroby z kovových plíšků EKG elektrod. Zároveň je při pohledu na předešlé grafy zobrazující měření bez enzymu možné říci, že tyto pomalé výkyvy hodnot nejsou způsobené pohybem elektrod ani teplotními výkyvy (jak bylo naznačeno u popisu prvního grafu), nýbrž materiálem elektrodového systému, protože tyto jevy se vyskytují u všech sad měření nezávisle na sobě. Tři průběhy roztoků se lehce odchylují od ostatních nižší hodnotou napětí. To může být zapříčiněno nižší teplotou roztoku během měření.



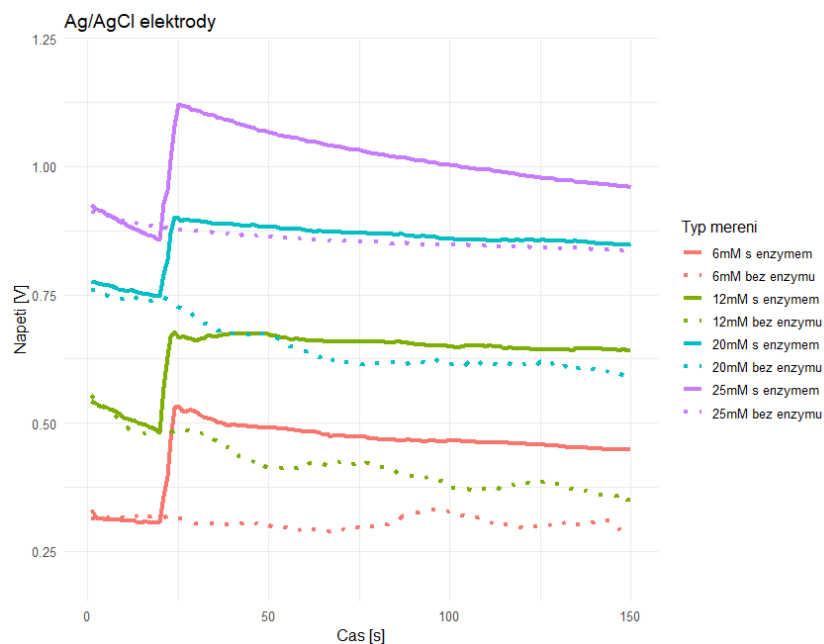
*Graf 5 Ag/AgCl elektrody 20mM bez enzymu*

Graf 6 vizualizuje průběhy napětí s aplikací enzymu do měřeného roztoku. Po nárůstu napětí dochází ke stabilizaci hodnot, nejsou patrné takové výkyvy jako v případě měření roztoků bez použití enzymu. Tento jev stabilizace je také shodný u všech měření, kde byl použit enzym.



*Graf 6 Ag/AgCl elektrody 20mM s enzymem*

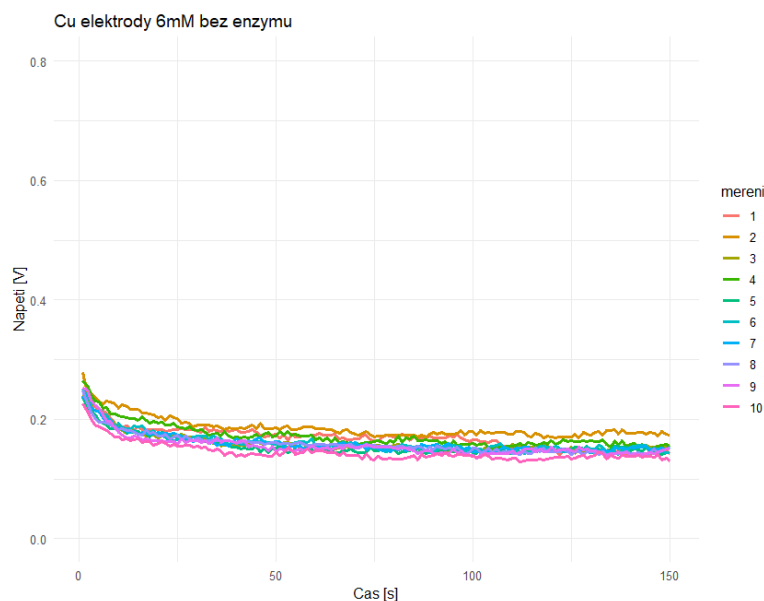
Do grafu 7 byly zaneseny náhodné sady měření pro lepší porovnání výstupních dat. Průběhy čárkované představují naměřené hodnoty bez enzymu a nepřerušované s aplikací enzymu v prvních 150 sekundách. Je přehledně vidět, že se zvyšující se koncentrací významně roste i výstupní napětí na měřicí elektrodě jak bez enzymu, tak i při experimentech s enzymem.



Graf 7 Porovnání napětí – Ag/AgCl

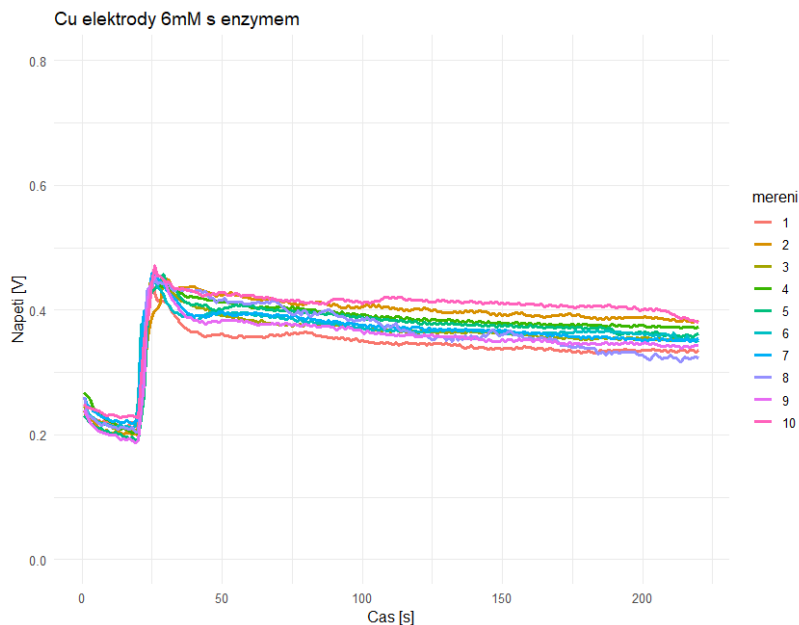
## 4.2 Měděné elektrody

Průběhy měření s koncentracemi roztoků o hodnotě 6 mmol/l a elektrodovým systémem obsahujícím měděné elektrody jsou ukázány v grafu 8. Ihned po aplikaci roztoku bez enzymu je naměřena nejvyšší hodnota z celého průběhu křivek. Potom dochází k rychlejšímu poklesu na určitou mez, od které se křivky chovají podobně jako u měření s předchozími elektrodami, tzn. hodnoty začínají klesat pomalu, ke konci měřicího intervalu to vypadá i na úplné ustálení, protože napětí kolísá kolem stále stejných hodnot. Rozdílem je to, že ačkoli se hodnoty napětí v čase také mění, k těmto změnám dochází rychleji. Hodnoty se tedy mění prudčeji než u předchozích elektrod.



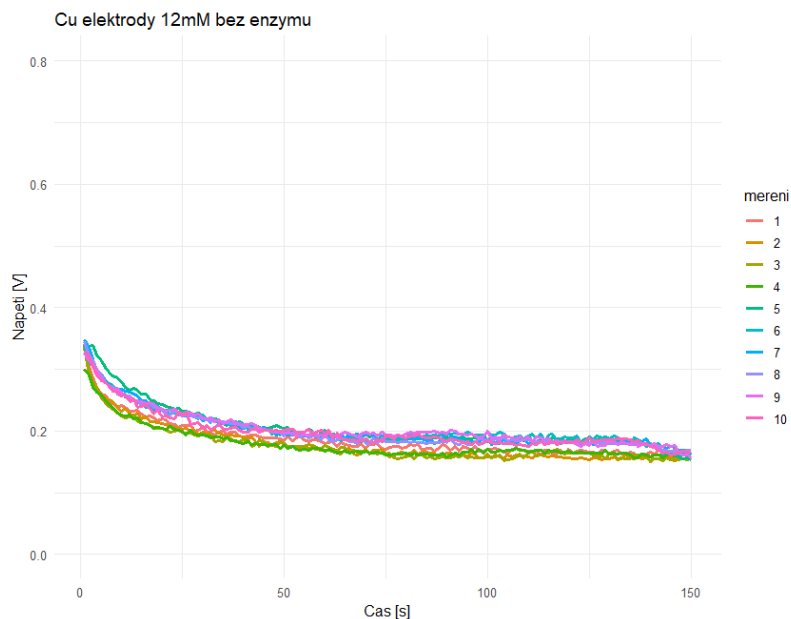
Graf 8 Měděné elektrody 6mM bez enzymu

Při snímání roztoku 6 mmol/l s enzymem (viz graf 9) je patrné, že po nárůstu napětí dochází po dosažení nejvyšší možné hodnoty k jejímu náhlému výraznému snížení. Poté křivky začínají klesat pomalu jako u argentchloridových elektrod.



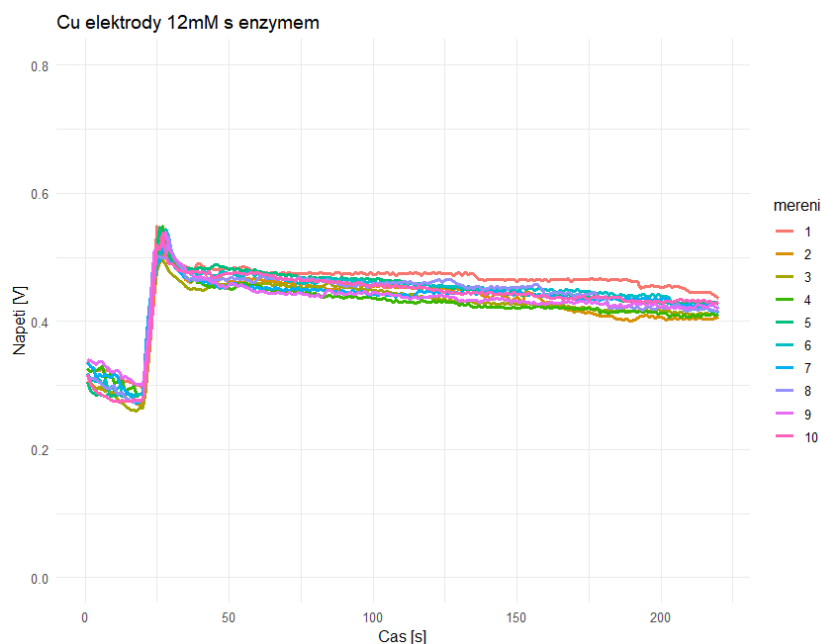
*Graf 9 Měděné elektrody 6mM s enzymem*

Po zhlédnutí průběhů napětí při měření roztoků o koncentraci glukózy 12 mmol/l v grafu 10 lze konstatovat, že křivky mají stejný charakter jako s ty nižší koncentrací, s tím rozdílem, že naměřené hodnoty jsou o něco vyšší, což bylo předpokládáno. Opět je tu v druhé polovině časového měřicího intervalu viditelné jisté ustálení hodnot a nepatrné rychlé změny napětí v čase probíhají kolem stejné hodnoty.



*Graf 10 Měděné elektrody 12mM bez enzymu*

V grafu 11 došlo po aplikaci enzymu a prudkém nárůstu napětí ke stabilnějšímu průběhu křivek. V druhé části časového úseku jsou ale viditelné nepatrné změny napětí u jednoho ze vzorků. To je pravděpodobně zapříčiněno nechtěným pohybem měděných elektrod v měřicím systému. Vzhledem k povaze změn musel být tento posun během experimentu opravdu minimální, protože dle zkušeností se vlivem pohybu elektrod dokáže napětí běžně změnit i o několik desetin, až o jednotku. Tento jev může souviset se vzdáleností mezi oběma elektrodami a následným ovlivněním celkového elektrického odporu a vodivosti elektrod.



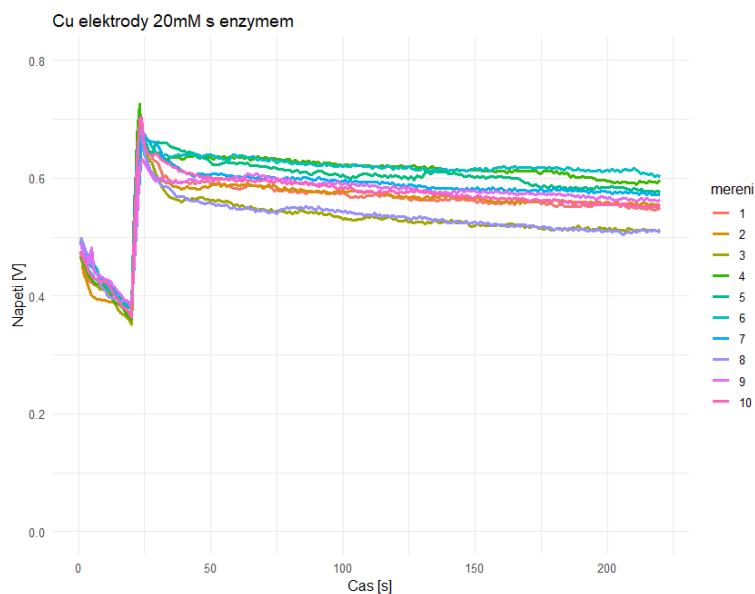
*Graf 11 Měděné elektrody 12mM s enzymem*

V grafu 12, který odkazuje na měření roztoků o koncentraci 20 mmol/l, je zřetelně vidět, jako u každého průběhu měření s měděnými elektrodami podstatně vyšší hodnoty v počátcích měření s následným rychlejším poklesem napětí na určitou hodnotu. Od té se pak hodnoty již moc nemění a zůstávají stabilní. Hodnoty křivek v tomto grafu navíc nepodléhají takovým rychlým změnám v čase jako v měřeních s nižšími koncentracemi glukózy a křivky mají velmi podobný průběh hodnot. S přihlédnutím k předchozím měřením s nižšími koncentracemi se tedy dá říci, že se zvyšující koncentrací roztoků došlo k vyšší podobnosti křivek, což samozřejmě nemusí nutně souviset s hodnotou koncentrace, ale jen s větší přesností měření a dokonalejším splnění podmínek pro nezávislé testování elektrodového systému.



*Graf 12 Měděné elektrody 20mM bez enzymu*

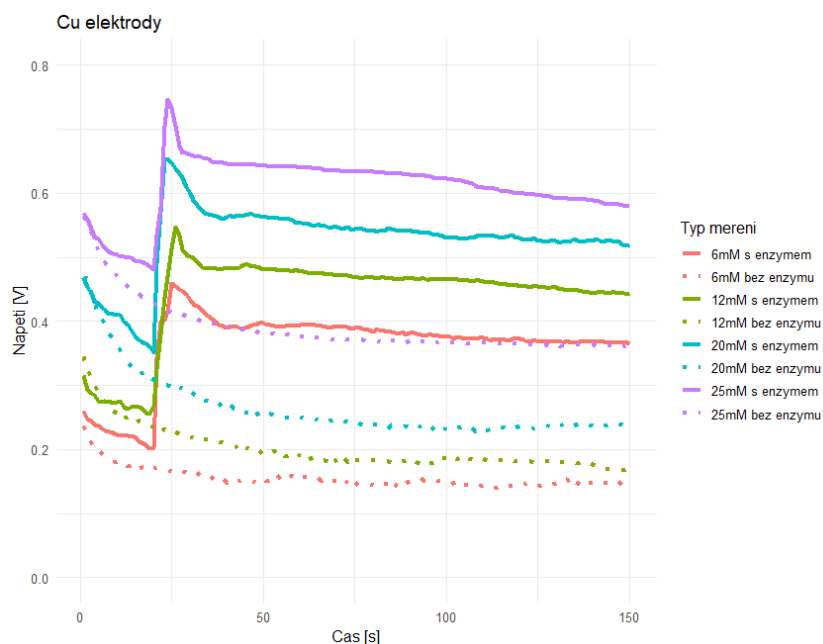
Graf 13 znázorňuje nárůst měřeného napětí po aplikaci enzymu. I zde je vidět větší stabilita nejen oproti měření bez enzymu, ale i v porovnání s průběhy napětí u nižších koncentrací. Po zhlédnutí předchozích průběhů s nižšími koncentracemi je možné konstatovat, že u měděných elektrod dochází po saturaci roztoku k prudšímu poklesu než u argentchloridových elektrod. Mírně vyšší hodnoty napětí po saturaci roztoku mohou být následkem vyšší teploty roztoku během měření, protože se zvyšující se teplotou roste i velikost napětí.



*Graf 13 Měděné elektrody 20mM s enzymem*

V grafu 14 jsou opět vyneseny náhodné průběhy napětí roztoků s enzymem a bez aplikace enzymu pro všechny vybrané koncentrace. I u konstrukce měděných elektrod je potvrzen předpoklad, že při použití enzymu jsou naměřeny vyšší hodnoty napětí. Platí i to, že se zvyšující se koncentrací

glukózy v roztoku roste výsledné napětí. Je patrný také stabilnější charakter u vzorku, do kterého byl přidán enzym. Klesání křivky v průběhu měření je vysvětleno zpomalováním chemické reakce.

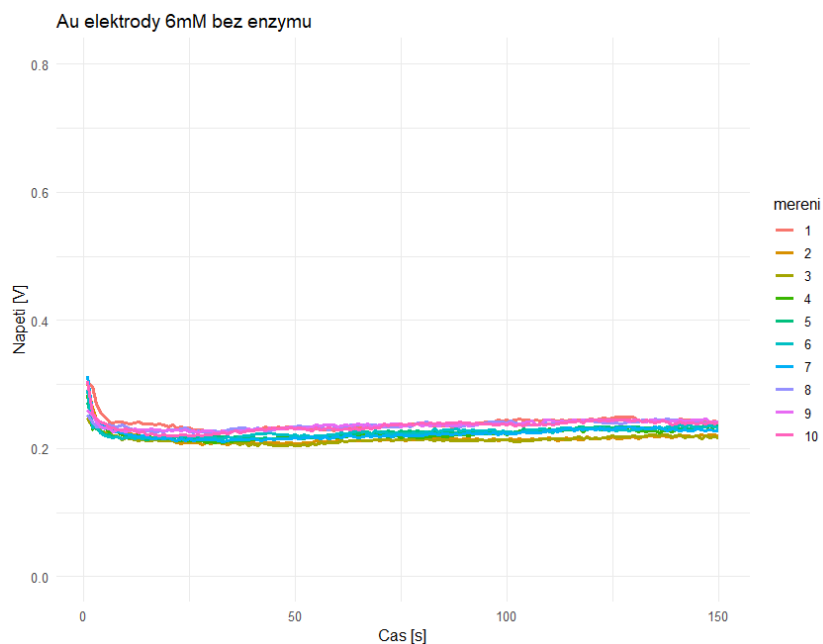


Graf 14 Porovnání napětí – měděné elektrody

### 4.3 Pozlacené elektrody

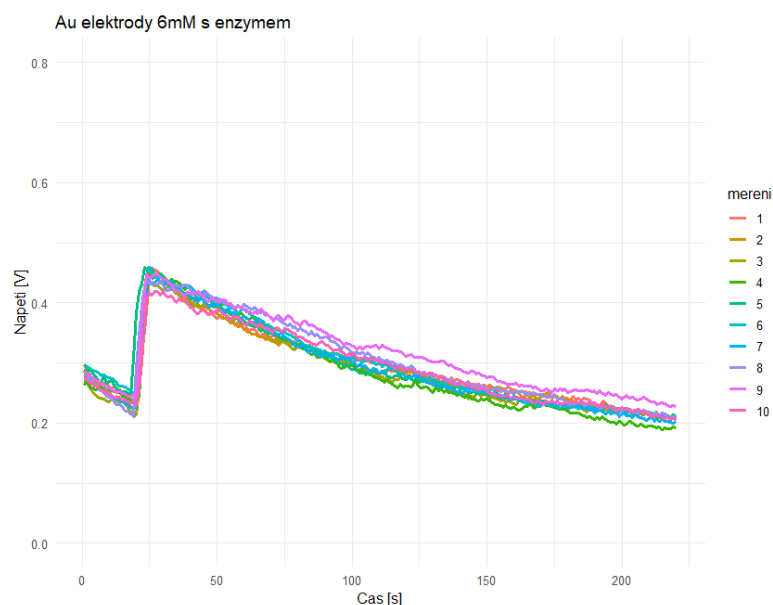
V grafu 15, ve kterém jsou zaneseny hodnoty odpovídající naměřeným napětím s roztoky o koncentraci glukózy 6 mmol/l a s elektrodovým systémem s pozlacenými elektrodami, je zřetelně vidět na začátku měření ještě prudší pokles hodnot než v předchozích případech. Po tomto časovém úseku ale následuje mírný pomalý vzestup hodnot s ustálením na konci měřeného intervalu. Jakýkoli vzestup hodnot nebyl patrný v žádném předchozím měření.





*Graf 15 Pozlacené elektrody 6mM bez enzymu*

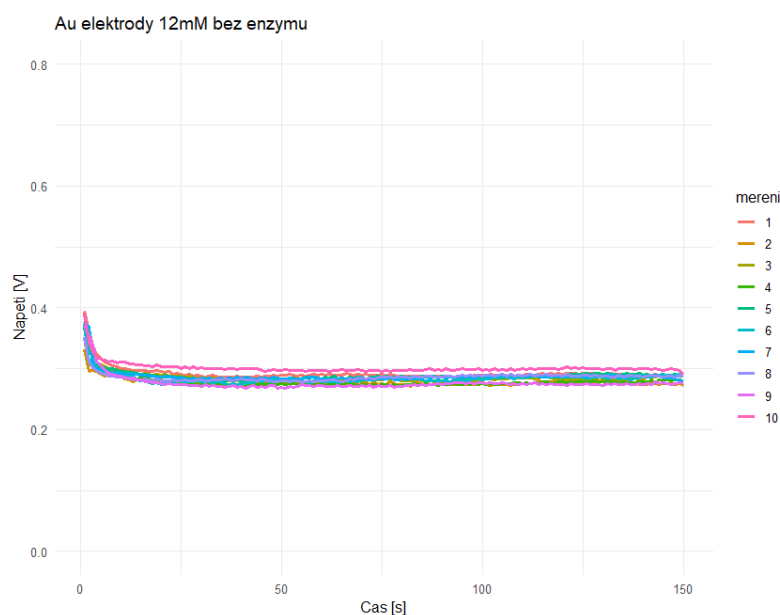
Graf 16 vyobrazuje průběhy napětí měřené s přidaným enzymem po prvních 20 sekundách snímání. Na rozdíl od průběhů s měděnými elektrodami nedochází po stavu saturace roztoku k malému rychlému poklesu hodnot, nicméně je zřejmý podstatně rychlejší pokles napětí než u ostatních materiálů elektrod.



*Graf 16 Pozlacené elektrody 6mM s enzymem*

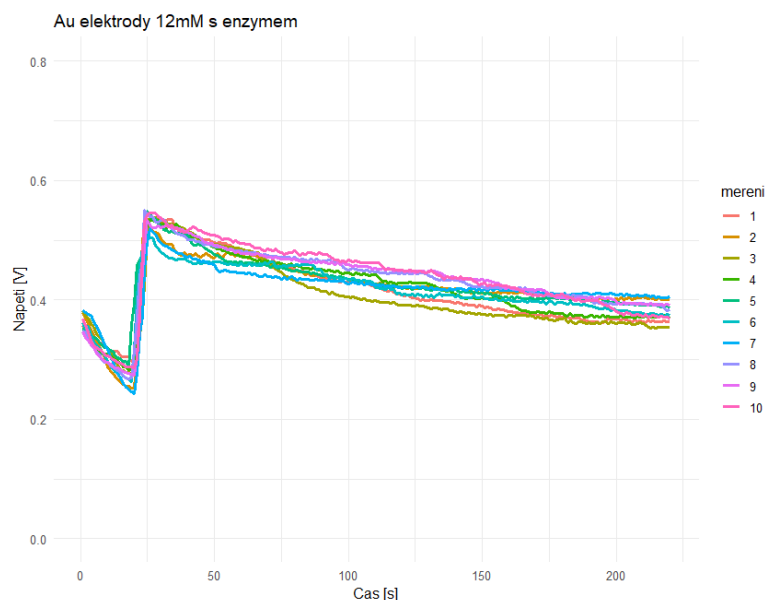
Průběhy napětí naměřené se samotnými roztoky o koncentraci 12 mmol/l jsou uvedeny v grafu 17. Zde je vidět, jak hodnoty na začátku měření nabývají i o jednu desetinu vyššího napětí než ve zbývajícím úseku měřeného časového intervalu. Navíc se hodnoty v ustálené části opět mírně zvýšily

jako u předchozího měření s nižší koncentrací. Vysoká napětí na začátku měření vznikají při aplikaci roztoku, po nanesení veškerého analyzovaného vzorku dochází k následnému ustálení.



*Graf 17 Pozlacené elektrody 12mM bez enzymu*

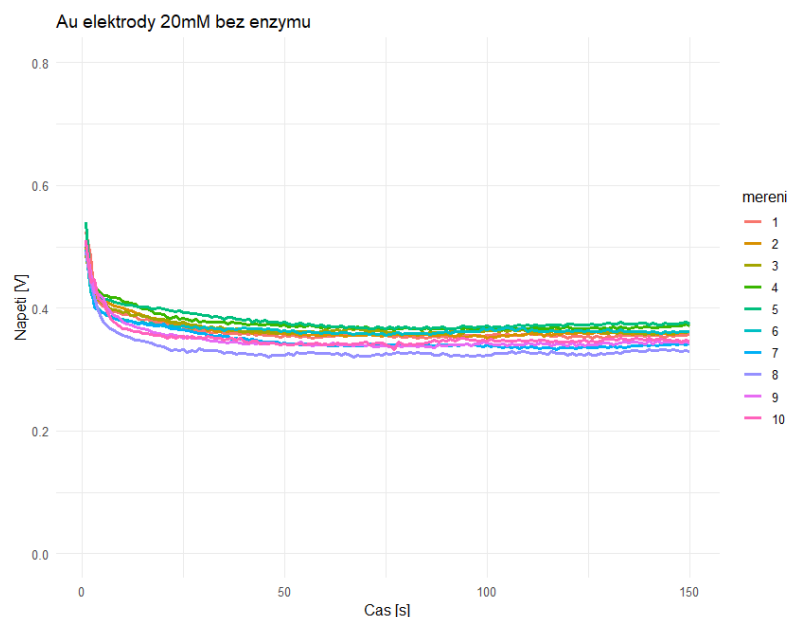
Graf 18 ukazuje postup napětí v čase s použitím enzymu. Malé prudší změny některých průběhů napětí mohou být přisuzovány nepatrnému pohybu měřicích elektrod, popřípadě vniknutí různých nečistot nebo vzduchových bublin do roztoku.



*Graf 18 Pozlacené elektrody 12mM s enzymem*

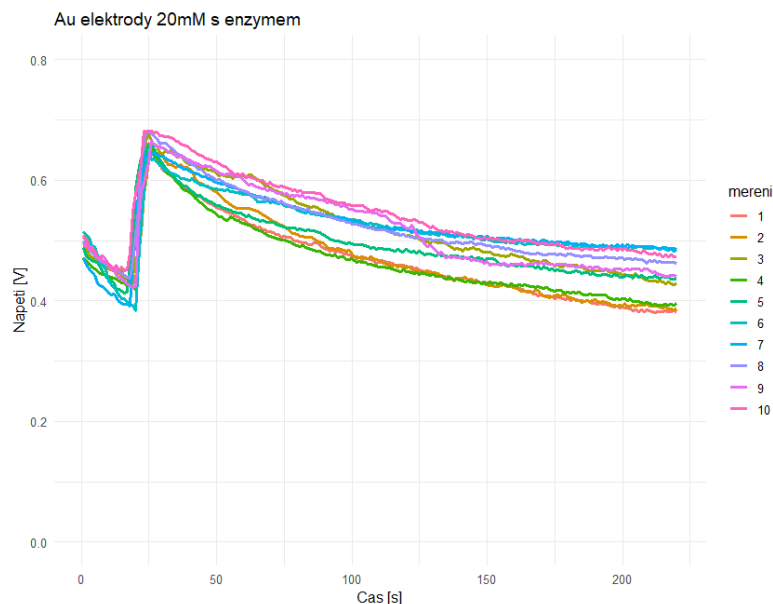
V grafu 19 je patrné, že se zvyšující se koncentrací dochází k prudšímu a rychlejšímu poklesu napětí během nanesení roztoku do měřicího místa. Poté je průběh napětí roztoků o koncentraci 20

mmol/l opět téměř lineární s mírným vzestupem na konci měřeného intervalu. Křivky jsou v celém měřeném úseku velmi podobné.



*Graf 19 Pozlacené elektrody 20mM bez enzymu*

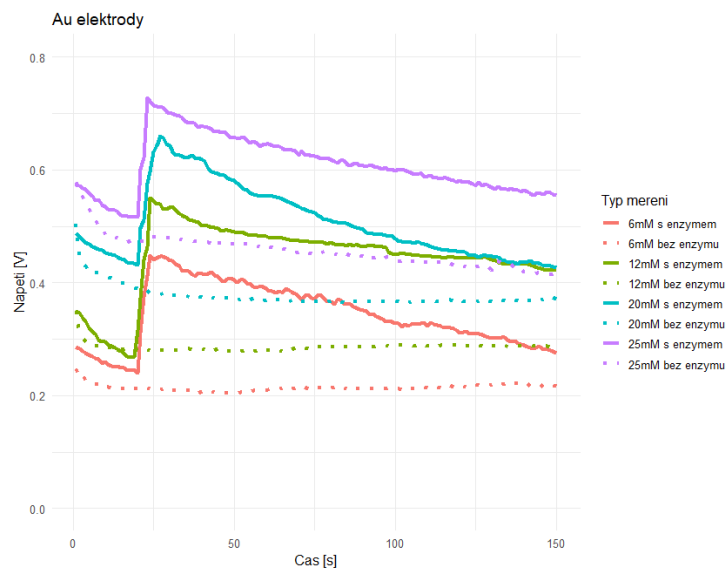
Průběhy v grafu 20 mají podobný charakter jako u předchozích nižších koncentrací po aplikaci enzymu. U pozlacených elektrod je lehce viditelný delší nárůst napětí po nanesení enzymu a následný delší prudší pokles než u ostatních materiálů elektrod. U pozlacených elektrod neplatí pravidlo, že po aplikaci roztoku jsou průběhy napětí stabilnější.



*Graf 20 Pozlacené elektrody 20mM s enzymem*

Poslední graf (graf 21) srovnává vybrané křivky naměřené s enzymem a bez enzymu u všech koncentrací pro lepší názornost splněního předpokladu, že s přidáním enzymu značně roste napětí.

V porovnání například s argentchloridovými elektrodami nárůst napětí není ale tak výrazný. Obecně, vyšší hodnoty napětí jsou u roztoků s vyšší koncentrací glukózy naměřeny proto, že ve více koncentrovaných roztocích se vyskytuje více molekul glukózy, tzn. v roztoku se vyskytuje více reakčních látek.

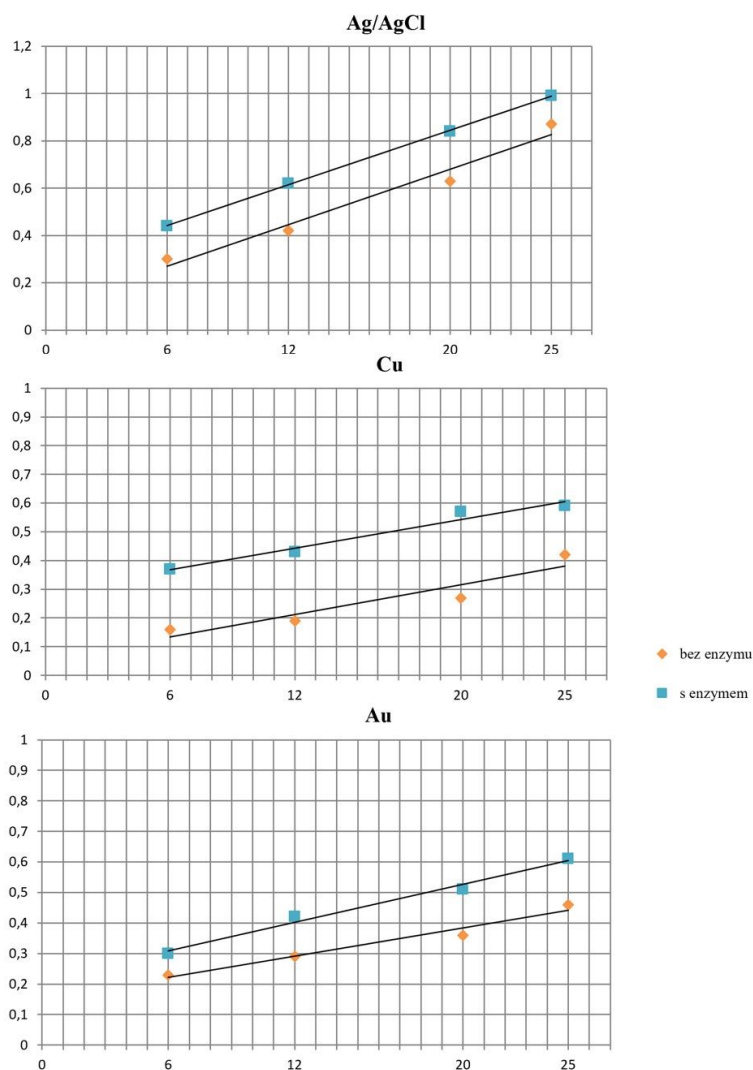


*Graf 21 Porovnání napětí – pozlacené elektrody*

## 5 Statistická analýza

Ke statistickému zpracování dat byl použit statistický program R, se kterým jsem byla seznámena během studia, a program Excel 2016. Jak již bylo popsáno, v rámci každé měřicí sady byly zaznamenávány hodnoty napětí detekované měřicí elektrodou během prvních 150 sekund měření bez použití enzymu a s enzymem prvních 220 sekund. Pro statistické zpracování je nutné série hodnot napětí zprůměrovat, aby bylo možné správně určit potřebné výstupy.

Jedním z předpokladů bylo, že se zvyšující se koncentrací roztoku glukózy roste i měřené napětí. To může být ověřeno zároveň s testem na lineární závislost mezi těmito dvěma veličinami. V rámci ověření závislosti testovaných dat bylo předpokládáno, že tak složité chemické reakce dějící se v roztoku glukózy nebudou mít lineární závislost mezi napětím a koncentrací. Pro lepší přehlednost v této problematice je vhodné se věnovat každému elektrodovému systému separátně a vytvořit pro ně bodové grafy, které naznačí, zdali je závislost hodnot napětí na koncentraci lineární a zda se se zvyšující se frekvencí zvyšuje i měřené napětí.



Graf 22 Bodové grafy – lineární závislost

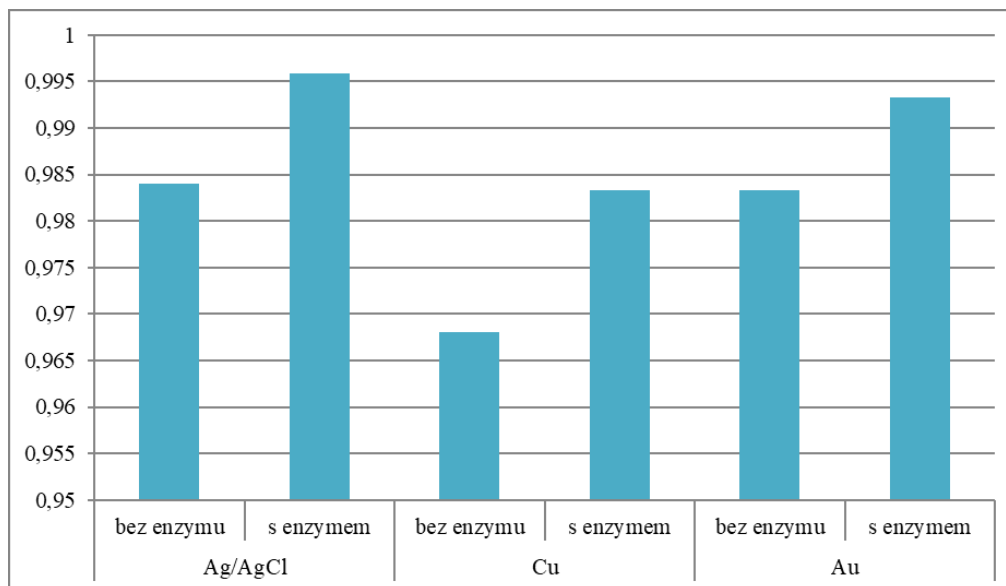
Z bodových grafů je evidentní, že se zvyšující se koncentrací glukózy v roztoku roste i napětí zjištěné pomocí elektrodového měřicího systému u všech materiálů elektrod. V návaznosti na tyto grafy je možné dále pokračovat ve zpracování dat s využitím korelační analýzy, jejímž cílem je získat údaje k porovnání síly závislosti vztahu mezi měřeným napětím a koncentrací roztoku. Pro určení síly závislosti je používán Pearsonův korelační koeficient. Na základě hodnoty tohoto koeficientu lze usuzovat sílu lineární závislosti testovaných dat. Hodnoty koeficientu blízké hodnotě 1 indikují přímou úměru mezi testovanými parametry, hodnoty blízké naopak  $-1$  indikují nepřímou úměru. Hodnoty okolo 0 indikují nezávislost parametrů.

Z aritmetických průměrů naměřených napětí v závislosti na koncentrovaném roztoku, materiálu elektrod a použití enzymu nebo jeho absenci byly vypočítány korelační koeficienty (viz Tab. 4).

Tab. 4 Korelační koeficienty

Aritmetický průměr	Koncentrace	Ag/AgCl		Cu		Au	
		bez enzymu	s enzymem	bez enzymu	s enzymem	bez enzymu	s enzymem
	6	0,30	0,44	0,16	0,37	0,23	0,30
	12	0,42	0,62	0,19	0,43	0,29	0,42
	20	0,63	0,84	0,27	0,57	0,36	0,51
	25	0,87	0,99	0,37	0,59	0,46	0,61
	<b>Korelace</b>	<b>0,984034157</b>	<b>0,995836775</b>	<b>0,96806106</b>	<b>0,983258322</b>	<b>0,983292897</b>	<b>0,993248592</b>

Výsledky testu ukázaly, že nejvyšší korelaci mezi napětím a koncentrací roztoku vykazuje metoda měření s enzymem za použití argentchloridových elektrod. Druhé nejvyšší korelační koeficienty se vyskytují u měření s argentchloridovými elektrodami bez aplikace enzymu a s pozlacenými elektrodami s enzymem (viz Graf 23).



Graf 23 Korelační koeficient

Tyto výsledky potvrzují, že mezi koncentrací roztoku a jeho naměřeným napětím se ani u jednoho z materiálů elektrod nevyskytuje přímá lineární závislost. Určení skutečné závislosti by mohlo být provedeno v rámci práce, ve které bude měřeno jen s jedním materiálem elektrod, jehož

statistické výsledky jsou nejpříznivější, a s velkým množstvím rozdílných koncentrací glukózy roztoků a velkým množstvím měřících pokusů. To by mohlo zajistit dostatečnou správnost teze o závislosti mezi těmito dvěma veličinami.

Následně bylo provedeno ve statistickém programu R testování hypotéz. Hypotézy byly zvoleny na základě výsledků experimentálního měření s následnou interpretací:

Elektrody Ag/AgCl měří vyšší napětí než Cu elektrody

Elektrody Ag/AgCl měří vyšší napětí než Au elektrody

Elektrody Au měří vyšší napětí než Cu elektrody

V úvodu bylo předpokládáno, že datové soubory v každé skupině mají normální rozdělení. Pro posouzení této hypotézy normálního rozdělení byl použit Lillieforsův test normality s hypotézami:

$H_0$  (nulová hypotéza): data mají normální rozdělení

$H_1$  (alternativní hypotéza): zamítnutí  $H_0$

Tab. 5 Test normality

	p-hodnota							
	Koncentrace 6mM		Koncentrace 12mM		Koncentrace 20mM		Koncentrace 25mM	
	bez enzymu	s enzymem	bez enzymu	s enzymem	bez enzymu	s enzymem	bez enzymu	s enzymem
Ag/AgCl	0,7975	0,5725	0,6774	0,8308	0,1519	0,7273	0,4311	0,2203
Au	0,3523	0,1150	0,3345	0,2631	0,0768	0,1094	0,8652	0,7900
Cu	0,4991	0,6502	0,1743	0,8552	0,1163	0,8000	0,7251	0,3311

Rozhodnutí o zamítnutí či nezamítnutí nulové hypotézy bylo vyřešeno na základě p-hodnot u jednotlivých měřících sad. Všechny tyto p-hodnoty vyšly větší než 0,05, a proto na 5% hladině významnosti nezamítáme nulovou hypotézu o normalitě dat.

Následně byl proveden test homoskedasticity (shody rozptylů), konkrétně Bartlettův test, jehož hypotézy byly následovné:

$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \dots = \sigma_k^2$

$H_1$ : zamítnutí  $H_0$

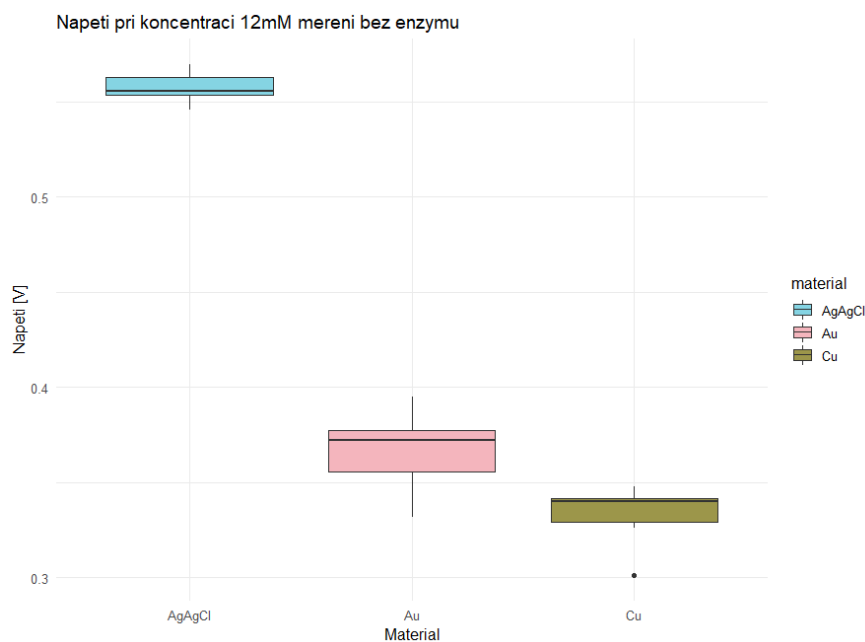
Tab. 6 Bartlettův test

	Koncentrace 6mM	Koncentrace 12mM	Koncentrace 20mM	Koncentrace 25mM
bez enzymu	0,2652	0,9279	0,2665	0,9303
s enzymem	0,4837	0,6658	0,5953	0,2791

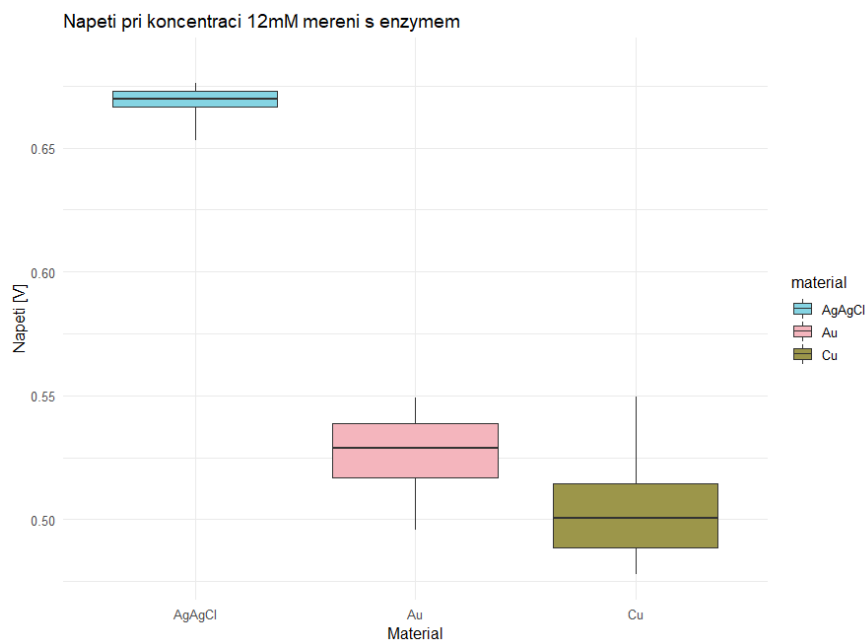
Ve všech případech měření s enzymem i bez enzymu byla výsledná p-hodnota větší než 0,05, a proto nezamítáme nulovou hypotézu o shodě rozptylů na 5% hladině významnosti a je možné aplikovat test na analýzu rozptylů.

Dalším vodítkem, které může pomoci ve správné analýze, je krabicový graf. Ten byl vytvořen zvlášť pro všechny koncentrace v rámci měřených materiálů a v závislosti na aplikaci enzymu. Každý krabicový graf má na horizontální ose jednotlivé typy materiálů elektrod a na svislé ose hodnoty napětí. V grafech (viz Graf 24,25) představuje čára uprostřed krabice medián, ohraničení krabice jsou 25% a 75% kvantil, chvosty jsou minimální a maximální pozorování, které nepřesahují hodnoty  $\pm 1,5 \times \text{IQR}$  (interkvartilové rozpětí). IQR bylo vypočítáno z rozdílu 75% kvantilu a z 25% kvantilu. Pozorování, které leží za těmito hodnotami, se značí v grafu tečkami a říká se jim outlier, odlehlá pozorování.

Pro představu jsou zde uvedeny dva krabicové grafy pořízené z dat naměřených pro roztoky o koncentraci 12 mmol/l, jeden pro měření bez enzymu a druhý s enzymem.



*Graf 24 Krabicový graf 12 mM bez enzymu*



*Graf 25 Krabicový graf 12 mM s enzymem*

Po zhlédnutí krabicových grafů je možné tvrdit, že grafy nevykazují žádné velké odchylky, na druhou stranu je důležité mít na paměti, že jsou konstruované z 10 pozorování a jejich vypovídající hodnota může být zkreslená menším výběrovým vzorkem. V kombinaci s testem normality tedy nezamítáme hypotézu o normálním rozdělení dat. Z těchto grafů je navíc patrné, že nejstabilnější



a zároveň nejvyšší hodnoty naměřených napětí vykazují argentchloridové elektrody. Měděné a pozlacené elektrody jsou co se týče stability na podobné úrovni.

Po posouzení hypotézy o normalitě dat a o shodě rozptylů bylo přistoupeno k dalšímu testování s Tukeyovým mnohonásobným porovnáním středních hodnot kvůli zjištění, které elektrody měří vyšší nebo nižší napětí a o kolik. Tento test navazuje na analýzu rozptylu a porovnává všechny páry materiálů mezi sebou a následně vypočítává p-hodnoty vzhledem k mnohonásobnému porovnávání. Pro použití právě tohoto testu bylo potřeba zjistit, zda hodnoty ve skupinách pochází z normálního rozdělení a zda jsou rozptyly datových výběrů shodné, což bylo vykonáno na začátku analýzy (test normality dat a homoskedasticity).

Hypotézy post-hoc analýzy byly formulovány následovně:

$H_0$ : střední hodnoty ve dvojicích se rovnají  $\rightarrow$  Ag/AgCl-Au, Au-Cu, Ag/AgCl-Cu

$H_1$ : střední hodnoty ve dvojicích se nerovnají

Opět, pokud je p-hodnota větší než hladina významnosti (5 %), rozdíl v průměrech není významný. Pokud je menší než hladina významnosti, rozdíl v průměrech je statisticky významný, což vychází ve všech analyzovaných případech. Výsledkem testu jsou i hodnoty, o kolik v průměru je tento rozdíl mezi dvěma materiály odlišný. Pokud se u hodnoty rozdílu vyskytuje znaménko mínus, tak to znamená, že druhý materiál v páru měří vyšší hodnoty. Kladná hodnota znamená, že první uvedený materiál v páru měří vyšší hodnoty.

Tab. 7 Tukeyův test – bez enzymu

bez enzymu	Koncentrace 6mM		Koncentrace 12mM		Koncentrace 20mM		Koncentrace 25mM	
	diference	p-hodnota	diference	p-hodnota	diference	p-hodnota	diference	p-hodnota
Au-Ag/AgCl	-0,0721	3,4565E-06	-0,1221	3,8147E-06	-0,2651	4,2486E-07	-0,4117	1,4424E-06
Cu-Ag/AgCl	-0,1432	3,1467E-07	-0,2252	3,6410E-07	-0,3735	3,0355E-06	-0,4657	5,9766E-07
Cu-Au	-0,0712	0,0194	-0,1031	0,0048	-0,1084	0,0028	-0,0539	0,0173

Konkrétně v tabulce (viz Tab. 8), kde jsou výsledky z testování bez enzymu, je ve všech případech p-hodnota menší než 0,05, a proto je nulová hypotéza zamítnuta a lze říct, že difference mezi napětíovými hodnotami jednotlivých materiálů jsou statisticky významné. Tyto difference je možné interpretovat u koncentrace 6 mmol/l následovně: Argentchloridové elektrody měří v průměru o 0,0721 V větší hodnoty než elektrody pozlacené a o 0,143 2 V než elektrody měděné. Elektrody pozlacené zase měří v průměru o 0,0712 V vyšší hodnoty než elektrody měděné. Tato interpretace je stejná u všech měřených koncentrací akorát s odlišnými hodnotami. To potvrzuje domněnku z krabicových a bodových grafů, že argentchloridové elektrody měří nejvyšší hodnoty napětí a měděné nejnižší.

Tab. 8 Tukeyův test – s enzymem

s enzymem	Koncentrace 6mM		Koncentrace 12mM		Koncentrace 20mM		Koncentrace 25mM	
	diference	p-hodnota	diference	p-hodnota	diference	p-hodnota	diference	p-hodnota
Au-Ag/AgCl	-0,1635	8,8454E-07	-0,1723	1,7093E-07	-0,2678	2,1911E-07	-0,3918	2,8063E-06
Cu-Ag/AgCl	-0,1790	9,0193E-06	-0,1913	1,2490E-06	-0,3450	2,2468E-06	-0,4066	3,0813E-06
Cu-Au	-0,0845	0,0206	-0,0191	0,0038	-0,0772	0,0129	-0,0148	0,0103

V případě testování s enzymem je interpretace podobná (opět jako příklad koncentrace 6 mmol/l): Elektrody argentchloridové měří v průměru napětí vyšší o 0,1635 V než pozlacené elektrody a o 0,1790 V než měděné elektrody. Pozlacené elektrody měří v průměru napětí vyšší o 0,0845 V než

elektrody měděné. P-hodnoty u všech dvojic materiálů jsou jako v předešlém případě menší než 0,05, a proto difference mezi naměřenými hodnotami je možné pokládat za statisticky významné. P-hodnoty jsou u dvojice Cu–Au výrazně větší, protože hodnoty naměřené těmito dvěma materiály si jsou v porovnání s Ag/AgCl velmi podobné. I přesto je ale p-hodnota menší než 0,05, a proto lze pokládat rozdíly mezi všemi materiály za statisticky významné.

Závěrečným výsledkem testování hypotéz je tedy skutečnost, že jednotlivé difference mezi materiály elektrod jsou statisticky významné a že výše průměrných naměřených hodnot u použitých elektrod jsou sestupně: Ag/AgCl, Au a Cu.

## Závěr

Cílem práce bylo vytvoření komplexního měřicího elektrodového systému, který je schopen v počítači zaznamenávat napětí odkazující na koncentraci glukózy ve zkoumaném roztoku. V práci byly popsány dva možné způsoby propojení systému s počítačem, z něhož jeden byl díky své větší spolehlivosti zvolen pro následující experiment. Během experimentálního měření byly vyzkoušeny tři materiály elektrod, argentschloridové, měděné a pozlacené.

Zajímavým výstupem diplomové práce je vzhled jednotlivých průběhů napětí mezi sadami měření s různými materiály elektrod. Pokud bychom zanedbali vysokou přesnost naměřených napětí a zaokrouhlili hodnoty na jedno desetinné místo, což je pro měření glukózy naprosto dostatečné, tak by byly hodnoty v jednotlivých sadách měření velmi podobné, až totožné. V případě, že vezmeme v potaz nezaokrouhlené hodnoty z jednotlivých měření, ve výsledných průbězích u všech třech materiálů jsou mezi hodnotami vidět znatelné rozdíly. Zde jsou tyto poznatky shrnuty.

Naměřené hodnoty pomocí argentschloridových elektrod jsou znatelně vyšší u všech koncentrací než hodnoty naměřené se stejnými koncentracemi s jinými materiály. Mezi průběhy odlišně koncentrovaných roztoků jsou větší napěťové rozdíly. Křivky při měření roztoku bez enzymu mají pomalu sestupný charakter s plynulými výkyvy v podobě krátkého vzrůstu a poté krátkého poklesu. Po aplikaci enzymu dochází k prudkému nárůstu napětí a poté k velmi pozvolnému snižování, v druhé polovině křivek se objevuje dokonce jisté ustálení. Během měření s enzymem se zdají hodnoty napětí stabilnější.

Měděné elektrody měří o poznání nižší napětí než předchozí. V průbězích měřených bez enzymu je vidět okamžik aplikace roztoku do stanoveného místa v podobě značně vyšších hodnot než ve zbylém měřicím úseku. Tento jev se u argentschloridových elektrod nevyskytoval. Jistou diferenci navíc představuje chování křivek s aplikací enzymu po saturaci roztoku, kdy po dosažení nejvyšší hodnoty dochází ke krátkému prudkému poklesu oproti elektrodám ostatním, kde je pokles od saturační hodnoty lineární. Následný pomalý pokles hodnot až do konce měřicího intervalu je o něco málo výraznější než u argentschloridových elektrod, se kterými mají společné i stabilnější hodnoty po aplikaci enzymu.

Pozlacené elektrody vytváří při měření bez enzymu podobné křivky jako měděné s tím rozdílem, že nárůst na začátku měření způsobený aplikací roztoku glukózy je o něco vyšší. Dále pokračují průběhy lineárně s mírným vzestupem a ustálením. Po aplikaci enzymu také došlo k prudkému navýšení hodnot napětí k určitému bodu, od kterého klesaly lineárně, ale s daleko větším sklonem, tzn. napětí se rychleji snižovalo. Hodnoty navíc oproti měřeným hodnotám bez enzymu nepůsobí stabilněji jako v předchozích dvou případech.

Nově zjištěné poznatky o odlišném chování jednotlivých materiálů vycházející z výstupů práce by bylo možné dále řešit bližším studiem struktury a chování kovů během různých chemických reakcí. Při těchto jevech se neuplatňují jen vlastnosti, jako jsou elektrická vodivost a odpor příslušných kovů, ale je potřeba se více zaměřit na studium elektrodových dějů a význam míry afinity jednotlivých prvků, ze kterých jsou elektrody tvořeny.

Ohledně výběru nejvhodnějšího materiálu pro měření koncentrace glukózy v roztoku byly na základě experimentálního měření a statistické analýzy zvoleny argentschloridové elektrody. Během měření s tímto materiálem byly naměřeny nejvyšší hodnoty ze všech zkoumaných soustav elektrod a zároveň mezi hodnotami napětí u jednotlivých koncentrací byly zjištěny daleko větší rozdíly než v případě zbylých dvou. Tato vlastnost je žádoucí převážně v případech měření blízkých koncentrací, kdy

by se u pozlacených a měděných elektrod mohlo stát, že hodnoty mezi rozdílnými koncentracemi by nebyly tak snáze mezi sebou rozeznatelné nebo dokonce by mohly být i nerozlišitelné. Tím pádem by docházelo k velkému zkreslení výsledků. Dále napětí měřená prostřednictvím argentchloridových elektrod byla v zásadě i nejstabilnější, tzn. křivky napětí se ze všech elektrod chovaly nejvíce ustáleně. Z výše uvedených důvodů je tedy oprávněné se domnívat, že nejvhodnějším materiálem pro další návazná měření jsou skutečně elektrody Ag/AgCl. Všechna tato tvrzení byla statisticky ověřena krabicovými grafy a testováním hypotéz. V rámci analýzy bylo také zjištěno, že závislost mezi koncentrací glukózy roztoku a jeho naměřeným napětím není lineární.

Všechna experimentální měření byla realizována na podkladě vytvořeného, plně funkčního měřicího a zobrazovacího systému, který je schopen detekovat elektrický proud vzniklý chemickou reakcí v roztoku, odkazující na koncentraci glukózy v něm měřené. Aktuální měřené napětí související s detekovaným elektrickým proudem z měřicího obvodu bylo zobrazováno v počítačovém programu pro snadné zaznamenávání průběhu chemických reakcí v roztoku glukózy a následné uložení ve formě experimentálně získaných dat.

Vzniklý detekční systém by v nadcházejících akademických pracích mohl být využit, jak už bylo výše nastíněno, pro zjištění přesné závislosti mezi koncentrací glukózy v roztoku a měřeným napětím, dále pro pátrání po příčinách charakteristického chování průběhů napětí jednotlivých materiálů nebo ke klinickému měření s plnou krví s následnou možnou návazností na řešení problematiky uchycení enzymu na povrch elektrod.

## Literatura

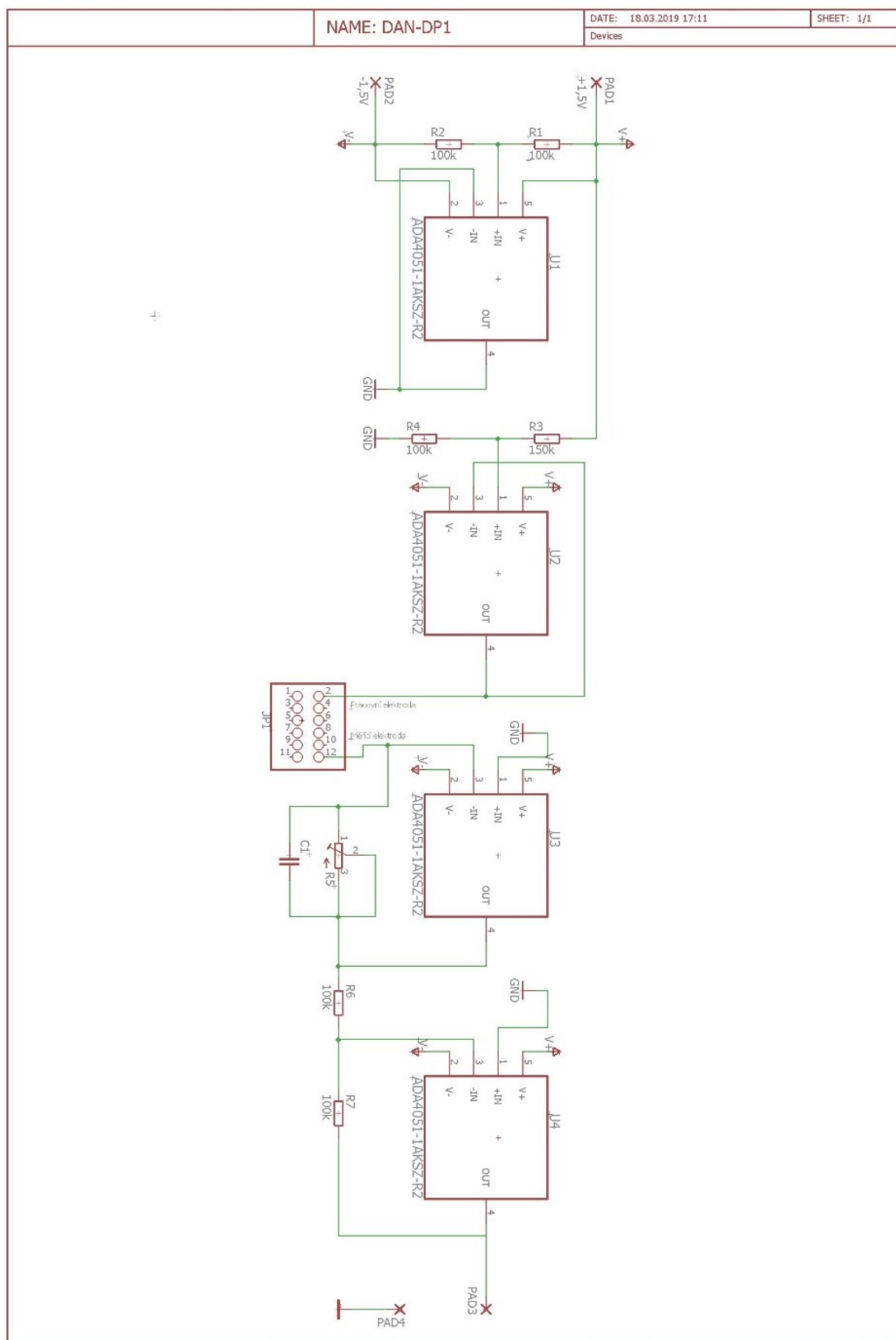
- [1] ALBERTS, Bray. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. Espero, 2005. Překlad Arnošt KOTYK, Bohumil BOUZEK a Pavel HOZÁK. 2. vyd. Ústí nad Labem. ISBN 80-902906-2-0.
- [2] BERNARD, Vladan. *Glukometr a jeho příbuzní*. Biofyzikální ústav LF, MU, 2011.
- [3] BROŽ, Jan. *Remedia: Současné možnosti monitorování glykémie* [online]. 2006 [cit. 2017-12-27]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Prehledy-nazory-diskuse/Soucasne-moznosti-monitorovani-glykemie/6-F-eG.magarticle.aspx>
- [4] DRÁPALA, Jaromír. *Materiály pro elektrotechniku*. Ostrava: VŠB-TUO, 2013. ISBN 978-80-248-3380-4.
- [5] FAJKUS, Petr. *Metoda měření krevního průtoku dilucí glukózy*. Ostrava, 2016. Diplomová práce. VŠB-TUO. Vedoucí práce Martin Augustýnek.
- [6] FIEDOROVÁ, Klára. *Návrh elektrody pro měření koncentrace glukózy v krvi*. Ostrava, 2017. Diplomová práce. VŠB-TUO. Vedoucí práce Martin Augustýnek.
- [7] FRIEDECKÝ, Bedřich, Josef KRATOCHVÍLA, Drahomíra SPRINGER, Martin PRÁZNÝ a Tomáš ZIMA. *Diabetes mellitus – laboratorní diagnostika a sledování stavu pacientů: Senzory a biosenzory*. Česká společnost klinické biochemie, 2015.
- [8] GARZINOVÁ, Romana. *Prvky řídicích systémů: učební text*. Ostrava: VŠB-TUO, 2012. ISBN 978-80-248-2581-6.
- [9] HRBÁČEK, Michal. *Systém automatického řízení glykémie*. Brno, 2015. Diplomová práce. VUT. Vedoucí práce Vratislav Harabiš.
- [10] CHUDOBOVÁ, Dagmar. *Elektrochemické metody pro identifikaci bakterií, senzory a biosenzory*. Brno. Mendelova univerzita.
- [11] JEDLIČKA, Petr. *Přehled obvodů CMOS 4000*. 4. vyd. Praha: BEN – technická literatura, 2005. ISBN 80-730-0167-5.
- [12] KOŠTÍŘ, Josef. *Biochemie*. Praha: AVICENUM, 1974. ISBN 08-066-74.
- [13] LITSCHMANNOVÁ, Martina. *Úvod do statistiky*. Ostrava: VŠB – TU Ostrava, 2011.
- [14] PALACKÝ, Petr. *Číslicová a mikroprocesorová technika: část první* [online]. VŠB Ostrava, 2012 [cit. 2019-01-07]. Učební text a návody do cvičení.
- [15] POLAN, Vojtěch. *Elektrochemické biosenzory*. Pardubice, 2015. Disertační práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Karel Vytrás.

- [16] ŠTEFAN, Radim. Měřicí karty-jak správně vybírat. *AUTOMA: časopis pro automatizační techniku* [online]. 2004(7) [cit. 2019-03-16]. Dostupné z: [http://automa.cz/cz/casopis-clanky/merici-karty-jak-spravne-vybirat-2004\\_07\\_32427\\_1913/](http://automa.cz/cz/casopis-clanky/merici-karty-jak-spravne-vybirat-2004_07_32427_1913/)
- [17] TÁBORSKÁ, Eva a Jaromír SLÁMA. *Lékařská chemie: Obecná a anorganická chemie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005.
- [18] TRÖGL, Josef. *AUTOMA: Biosenzory* [online]. 2006 [cit. 2017-12-27]. Dostupné z: [http://automa.cz/cz/casopis-clanky/biosenzory-2006\\_04\\_31055\\_558/](http://automa.cz/cz/casopis-clanky/biosenzory-2006_04_31055_558/)
- [19] *Učebnice: Referentní elektrody* [online]. [cit. 2017-12-27]. Dostupné z: [http://ach.upol.cz/ucebnice2/ref\\_eldy.htm](http://ach.upol.cz/ucebnice2/ref_eldy.htm)
- [20] UHROVÁ, Helena. *Biosenzory* [online]. Praha: VŠCHT [cit. 2017-12-27]. Dostupné z: <https://fchi.vscht.cz/files/uzel/0010359/002Biosenzory.pdf?redirected>
- [21] VÍTOVÁ, Hana. *Neinvazivní měření glukózy v krvi*. Brno, 2012. Diplomová práce. VUT. Vedoucí práce Jiří Sekora.
- [22] VOKOUNOVÁ, Michaela. *Studie dlouhodobé stability senzoru glukózy pro kontinuální monitorování glykémie*. Brno, 2016. Bakalářská práce. LF Masarykova univerzita. Vedoucí práce Jan Krejčí.
- [23] ZÁHLAVA, Vít. *Návrh a konstrukce desek plošných spojů: principy a pravidla praktického návrhu*. Praha: BEN-technická literatura, 2010. ISBN 978-80-7300-266-4.
- [24] ŽÍDEK, Jan. *LabVIEW a Virtuální instrumentace*. VŠB – TU Ostrava.

## Seznam příloh

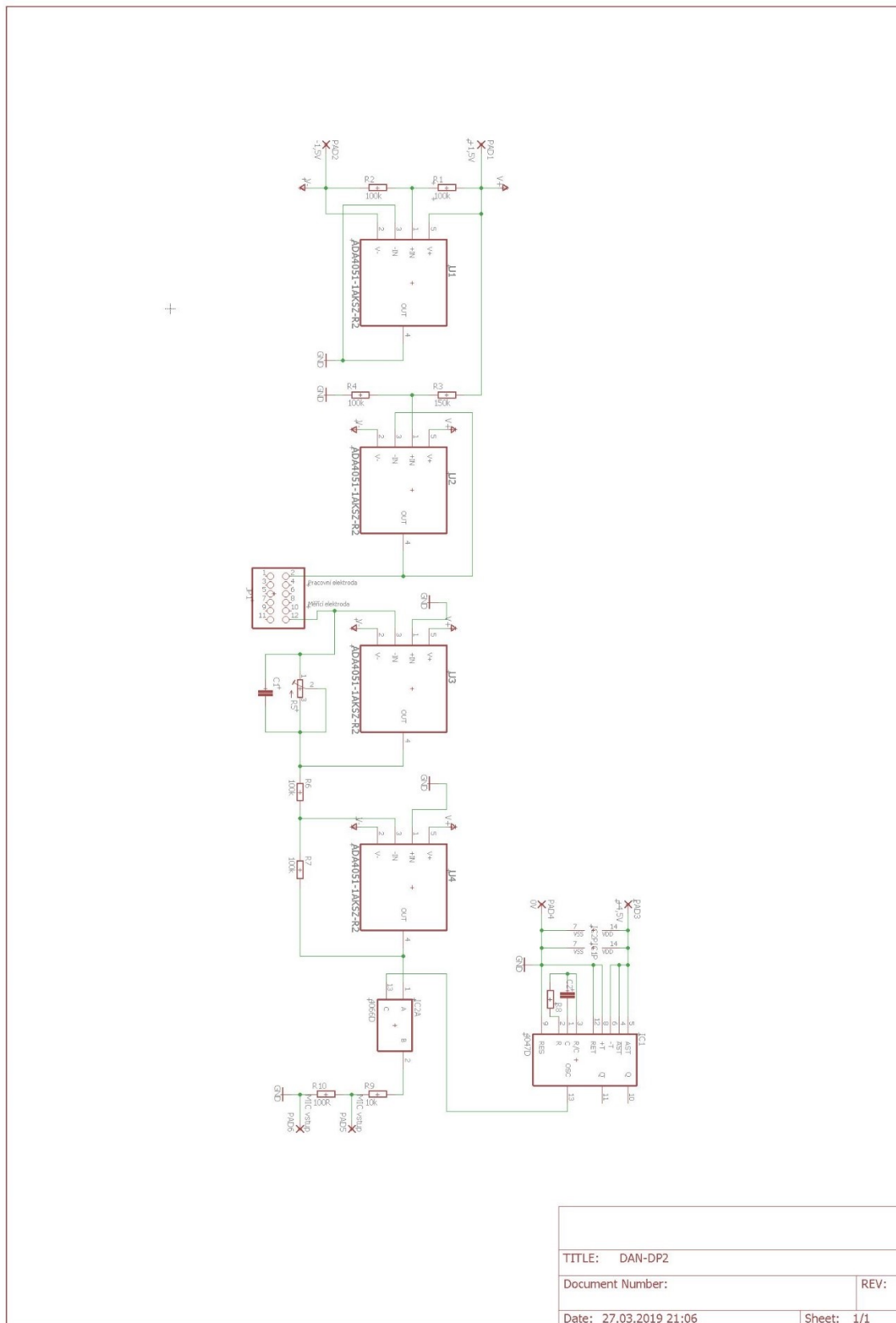
Příloha I	EAGLE – schéma zapojení pro měřicí kartu.....	I
Příloha II	EAGLE – schéma zapojení pro mikrofonní vstup .....	II
Příloha III	Kompletní HW s navrženým ochranným krytem.....	III
Příloha IV	Váha na měření množství enzymu.....	III
Příloha V	Uložená naměřená data v programu Excel – ukázka.....	IV
Příloha VI	CD .....	IV

**Příloha I** **EAGLE – schéma zapojení pro měřící kartu**

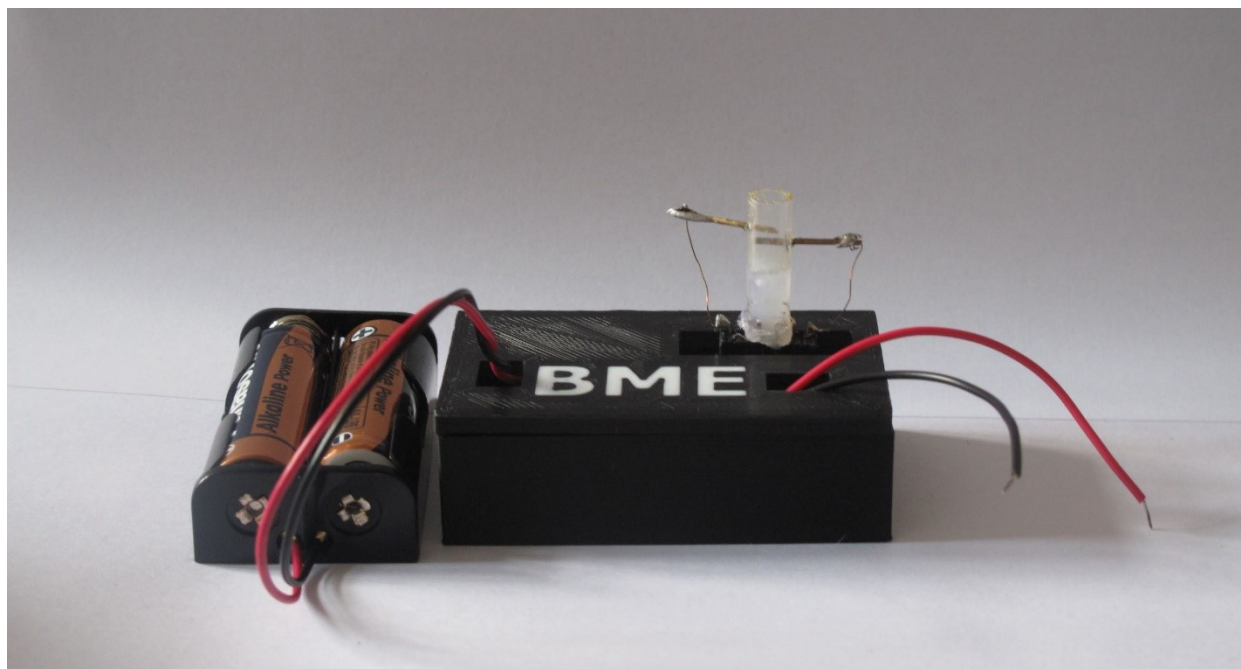




**Příloha II EAGLE – schéma zapojení pro mikrofonní vstup**



***Příloha III      Kompletní HW s navrženým ochranným krytem***



***Příloha IV      Váha na měření množství enzymu***



***Příloha V      Uložená naměřená data v programu Excel – ukázka***

20.02.2019 19:35:55	0,290703483
20.02.2019 19:35:56	0,28177472
20.02.2019 19:35:57	0,279861413
20.02.2019 19:35:58	0,272845956
20.02.2019 19:35:59	0,264554961
20.02.2019 19:36:00	0,263917192
20.02.2019 19:36:01	0,257539504
20.02.2019 19:36:02	0,258815042
20.02.2019 19:36:03	0,247972971
20.02.2019 19:36:04	0,251799584
20.02.2019 19:36:05	0,239044208
20.02.2019 19:36:06	0,239681976
20.02.2019 19:36:07	0,243508589
20.02.2019 19:36:08	0,237130901
20.02.2019 19:36:09	0,2269266
20.02.2019 19:36:10	0,233304288
20.02.2019 19:36:11	0,223099987
20.02.2019 19:36:12	0,224375524

***Příloha VI      CD***

1. Dokumenty k součástkám – datasheet
2. EAGLE a INVERTOR
3. Programy v LabVIEW
4. Video a fotografie z měření
5. Kompletní naměřená data + grafy 25 mM
6. Elektronická verze diplomové práce